

DETERMINACIÓN DE, CLORPIRIFÓS EN PACÚ ARROCERO

ESPECTROFOTOMETRÍA Y EXTRACCIÓN POR SPE

ALUMNA: MENDEZ, NAHARA TAMARA
DIRECTORA: MONZÓN, CELINA MARIA
COLABORADOR: DELFINO, MARIO RAÚL

AÑO 2022
FACENA-UNNE

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	Pág 3
PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	Pág 3
OBJETIVOS.....	Pág 4
• Generales. Específicos	
CLORPIRIFÓS.....	Pág 5
CLORPIRIFÓS COMERCIAL.....	Pág 5
DESARROLLO.....	Pág 6
ESPECTROFOTOMETRÍA.....	Pág 6
• Espectro de absorción. Curva de calibrado	
PRIMER PARTE: ANÁLISIS SOLUCIÓN DE CLORPIRIFÓS COMERCIAL EN SOLUCIÓN ACUOSA.....	Pág 7
• Espectrofotometría. Preparación de las soluciones . Espectro de absorción. Curva de calibrado	
MÉTODO DE EXTRACCIÓN:SPE.....	Pág 11
• Etapas. Procedimiento	
ATRIBUTOS DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE EXTRACCIÓN: SPE.....	Pág 12
• Linealidad. Precisión. Desviación estándar. Procedimientos.	
SEGUNDA PARTE: ANÁLISIS DE SOLUCIÓN DE CLORPIRIFÓS EN CARNE DE PACÚ ARROCERO.....	Pág 17
• Muestra de pacú arrocero. Procedimiento. Resultados	
HPLC.....	Pág 19
• HPLC: características. Resultados preliminares	
OBSERVACIONES.....	Pág 21
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	Pág 22
CONCLUSIÓN.....	Pág 22
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	Pág 23

INFORME PRÁCTICA ELECTIVA

**Tema: Determinación de agroquímicos en muestras biológicas, carne de pacú arrocero
(*Piaractus mesopotamicus*)**

**Titulo del trabajo: “ DETERMINACIÓN DE CLORPIRIFÓS EN CARNE DE PACÚ ARROCERO POR
ESPECTROFOTOMETRIA Y EXTRACCIÓN POR SPE”**

INTRODUCCIÓN

La producción de pacú (*Piaractus mesopotamicus*) representa el 40% del cultivo ictícola del nordeste argentino [1]. Los sistemas de alternancia entre agricultura y piscicultura son muy utilizados hace tiempo en China, Bangladesh, India, Corea, Malasia, Filipinas, Tailandia, Vietnam y Madagascar [2]. En nuestro país, desde el año 2011, se implementa en la provincia del Chaco un sistema de alternancia consistente en la explotación combinada y rotativa de pacú y arroz. [3]. Hay un incremento en la fertilidad del suelo por el aporte de la excreción de los peces sumado a la existencia de una gran cantidad de organismos que están presentes en el agua durante el ciclo del cultivo de peces. Este sistema de alternancia disminuye las labores y prácticas agrícolas e intenta tener mayor sustentabilidad que el modelo tradicional de producción de arroz.

En el ciclo de siembra de arroz se utilizan agroquímicos (herbicidas, insecticidas y fertilizantes) los cuales sufren diversos procesos como ser: degradación, volatilización, adsorción, lixiviación en el suelo y en el agua de cultivo. Estos agroquímicos y sus productos de degradación pueden permanecer en el ambiente durante períodos significativos de tiempo, con diferentes grados de toxicidad y con efectos contaminantes sobre el medio [4]. Sin embargo los agroquímicos son una necesidad en la agricultura, y continuarán siendo una parte importante de la tecnología agrícola en un futuro próximo [5]. Es imposible mantener la expansión agrícola, acorde con las necesidades de alimento a nivel mundial, sin el uso de agroquímicos [6].

Entre los agroquímicos utilizados en cultivos de arroz podemos nombrar: clorpirifós, glifosato, imazapic, imazapir, bispiribac sódico, clomazone, picloram, penoxsulam, cyhalofop butil ester, bentazone, ácido dicloro fenoxiacético, cipermetrina, pirimicarb, carbasulfam, entre otros. El glifosato es el más ampliamente usado a nivel mundial.

PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El sistema de rotación de arroz y pacú surgió como una nueva alternativa en zonas consideradas como marginales para otros cultivos o actividades agropecuarias por la baja aptitud de suelos. El fundamento de esta rotación se basa en la de producir en un mismo terreno un ciclo de cultivo de arroz seguido de otro periodo de peces, esto genera una sinergia entre ambas actividades que otorga beneficios monetarios y ambientales. [7]

Sin embargo al ser actividades que necesitan control de diversas plagas es una producción que no está exenta del uso de diversos agroquímicos. Estos compuestos usados para combatir las plagas en agricultura es una fuente de intoxicación de la piscicultura, éstos pueden ser

insecticidas, herbicidas o fungicidas. Pueden destruir el plancton, que es el alimento de los peces, como también causar la muerte de los peces.[5]

Es por ello que es necesario estudiar los residuos de agroquímicos (como por ejemplo clorpirifós, glifosato, etc.) en la carne del pacú, debido a que es un producto cárnico consumido por los seres humanos y genera un gran impacto en la salud.

El desarrollo de métodos analíticos capaces de determinar residuos de agroquímicos en las diferentes matrices medioambientales, debe realizarse de una manera fiable y con procedimientos de extracción efectivos y rápidos que requieran volúmenes mínimos de disolventes que son de elevado costo y tóxicos para el analista y el medio ambiente.

Se estudió carne de pacú criado por sistema rotativo arroz-pacú. Se desarrollaron métodos de extracción en fase sólida (SPE) con el fin de extraer y concentrar residuos de agroquímicos del tejido de pacú. Se aplicaron técnicas cuantitativas como espectrometría y HPLC.

OBJETIVOS

Generales:

1. Brindar al alumno que está finalizando el Ciclo de Formación Profesional, un espacio curricular que le permita profundizar su capacitación en distintos campos disciplinares de la Bioquímica.
2. Posibilitar un mayor desarrollo de competencias en aspectos no tradicionales del perfil profesional y que presentan una importante demanda como: Análisis instrumental, Investigación Básica, Investigación Aplicada.
3. Adquirir destreza en el desarrollo de técnicas instrumentales para determinación de analitos e interpretación de resultados.

Particulares:

1. Utilizar técnicas separativas destinadas a la determinación de residuos de agroquímicos en muestras biológicas: carne de Pacú (*Piaractus mesopotamicus*) criado en agua de arroceras.
2. Desarrollar, optimizar y validar métodos analíticos para la extracción y cuantificación de residuos de agroquímicos en tejido de pacú, utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría.
3. Aplicar los métodos desarrollados a carne de pacúes criados en arroceras como así también a muestras de pacú de río.
4. Aportar a la comunidad científica y a los productores métodos eficientes de análisis

CLORPIRIFÓS CAS#: 2921-88-2

Nomenclatura química: 0,0-dietilfosforotioato de 0-3,5,6-tricloro-2-piridilo ó 0,0-dietil 0-(3,5,6-tricloro-2- piridil) fosforotioato.

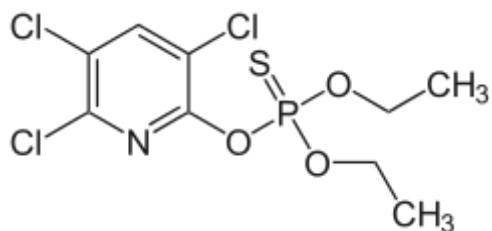


Figura 1: estructura del clorpirifós

El clorpirifós es un sólido blanco de apariencia cristalina y de aroma fuerte.

Es un insecticida organofosforado de amplio uso en las viviendas y en la agricultura. El clorpirifós se ha utilizado en las casas para controlar las cucarachas, pulgas y termitas, también se ha usado como ingrediente activo en ciertos collares antipulgas para animales domésticos. En la agricultura se utiliza para controlar las garrapatas del ganado y se rocía en los cultivos para controlar las plagas. [8]

Su modo de acción es por contacto, inhalación e ingestión. Inhibe la acetilcolinesterasa causando envenenamiento por colapso del sistema nervioso del insecto. Los organofosforados actúan inhibiendo la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina, lo que conduce a la transmisión continua del impulso nervioso en el axón, llevando a la parálisis muscular y luego a la muerte.

Es un insecticida recomendado para el control de insectos chupadores y masticadores. No es fitotóxico para los cultivos a las dosis recomendadas. Es compatible en aplicaciones foliares con otros productos.

Clorpirifós comercial

Es un polvo para espolvoreo especialmente preparado para ser aplicado en forma original sin disolverlo en agua. Su gran poder residual lo constituye en el insecticida ideal para controlar las hormigas arrieras o cortadoras, aplicado directamente sobre el suelo o mediante una bomba espolvoreadora. Que tiene como ingrediente activo el clorpirifós en una concentración del 2.5 % p/p. [9]

CARACTERÍSTICA DE CALIDAD: ESPECIFICACIONES

Aspecto físico: Polvo fino color claro. %

No Volátiles: mayor del 92%.

Contenido de CLORPIRIFOS: 2.325 – 2.675 % p/p %

Humedad por secado: menor del 8%



Figura 2: presentación comercial del clorpirifós 2,5% p/p

DESARROLLO

En el presente trabajo se trabajó con el agroquímico clorpirifós en primer lugar estudiándolo en soluciones acuosas de diferentes concentraciones y utilizando como técnica analítica la espectrofotometría. Se realizó el espectro de absorción y curva de calibrado. Luego utilizando el método de extracción de SPE se procedió a realizar la separación del compuesto de la solución original, también algunos atributos que complementaran a futuro la validación del método. Posteriormente se realizaron ensayos sobre la carne del pacú arrocero, con técnica de sobreagregado de la solución de clorpirifós a una concentración dada, extrayendo con SPE y midiendo su concentración por espectrofotometría.

En una segunda instancia se efectuaron pruebas con HPLC que servirán para estudios posteriores.

ESPECTROFOTOMETRIA

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma. [10]

ESPECTRO DE ABSORCIÓN: El espectro de absorción es una representación gráfica que indica cantidad de luz absorbida (ϵ) a diferentes valores de λ . A partir de una solución diluida de un compuesto, cuya absorbancia máxima entra dentro del rango de medida del espectrofotómetro, se verá el valor de absorbancia a diferentes longitudes de onda frente a un blanco que contenga el disolvente de la solución de la muestra a caracterizar. A partir del espectro de absorción se obtendrá el valor de λ al que el compuesto presenta la mayor absorbancia (λ_{max}). Dicho λ se utilizará a la hora de hacer determinaciones cualitativas y cuantitativas del compuesto. [10]

CURVA DE CALIBRADO: Para obtener una curva de calibrado de un compuesto se preparan soluciones de diferentes concentraciones del mismo, determinándose para cada una de ellas el valor de absorbancia a λ_{max} . Estos valores de absorbancia se representan en el eje de abscisas (eje de x) y los de concentración en el eje de ordenadas (eje de y). Se observará que, a bajas concentraciones, el aumento de concentración se corresponde con un incremento lineal en la absorbancia (zona de cumplimiento de la ley de Lambert-Beer). A concentraciones altas la linealidad se pierde y se observa que la línea se aplana, por lo que las medidas son poco fiables. La representación de Lambert-Beer, $A = \epsilon \cdot c \cdot l$, nos permitirá calcular el valor del coeficiente de extinción molar, que corresponde a la pendiente de la recta. [10]

1) PRIMER PARTE: ANÁLISIS DE CLORPIRIFÓS COMERCIAL EN SOLUCIÓN ACUOSA

a) ESPECTROFOTOMETRIA

- Espectrofotómetro UV-Visible Metash Instruments UV-5100B
- Cubeta de cuarzo UV



Figura 3: espectrofotómetro y cubetas de cuarzo.

b) PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE CLORPIRIFÓS: 10 mg/ml

- I. Se pesó 1g de la muestra comercial de concentración 2,5% p/p de clorpirifós y se disolvió en agua destilada llevando a volumen en un matraz de 100ml.
- II. Se trasvasó la solución a un vaso de precipitado y se colocó en un agitador con un buzo magnético.
- III. Luego se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos.
- IV. Se usó el sobrenadante.

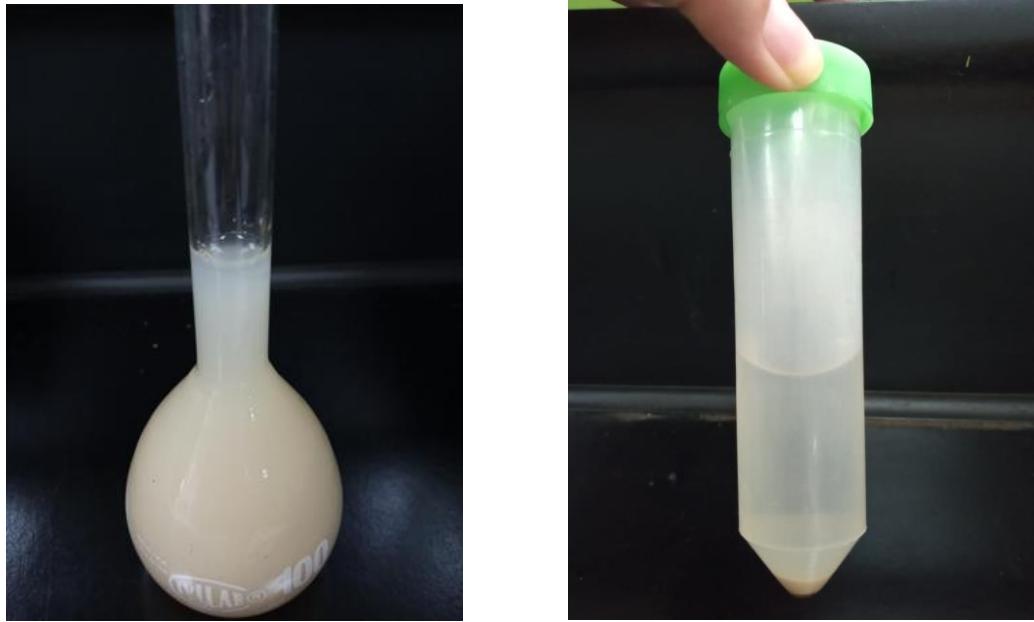


Figura 4: solución de clorpirifós antes y luego de centrifugar



Figura 5: Balanza analítica, centrifuga y agitador magnético.

c) ESPECTRO DE ABSORCIÓN

Para la realización del espectro de absorción se utilizó una solución de clorpirifós de 5mg/ml utilizando las cubetas de cuarzo y realizando un barrido en el espectrofotómetro.

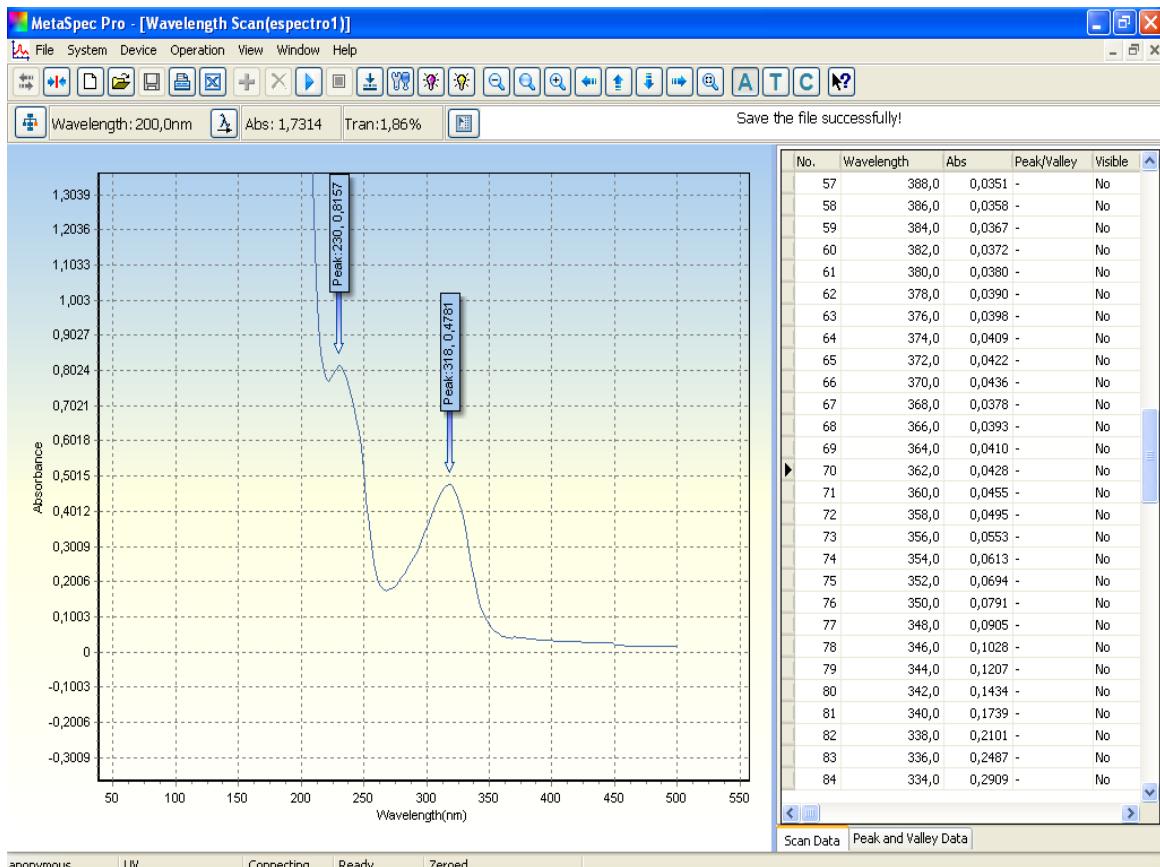
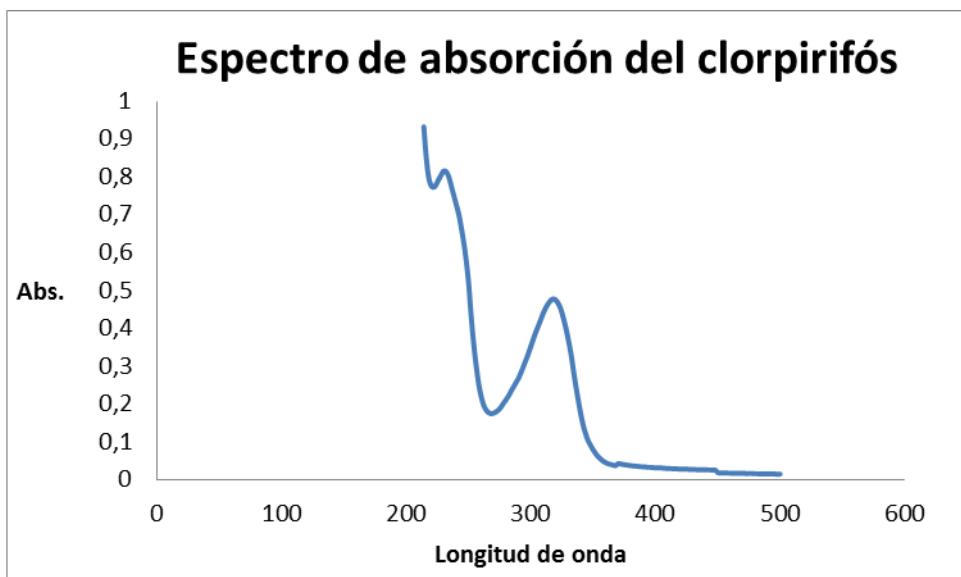


Figura 6: espectro de absorción del clorpirifós



d) CURVA DE CALIBRADO

Se prepararon soluciones de concentración de clorpirimofos de 1, 2, 3, 4 y 5 mg/ml a partir de la solución madre de 10 mg/ml, luego se realizaron la correspondiente curva de calibración a 229nm.

Concentración mg/ml	absorbancia
0	0
1	0,2052
1	0,2049
1	0,2051
2	0,4094
2	0,4095
2	0,4094
3	0,613
3	0,6132
3	0,6136
4	0,7921
4	0,7923
4	0,7922
5	0,9924
5	0,9922
5	0,9923
10	1,93
10	1,9281
10	1,9290

Tabla 1: valores de concentraciones y absorbancias de soluciones de clorpirimofos

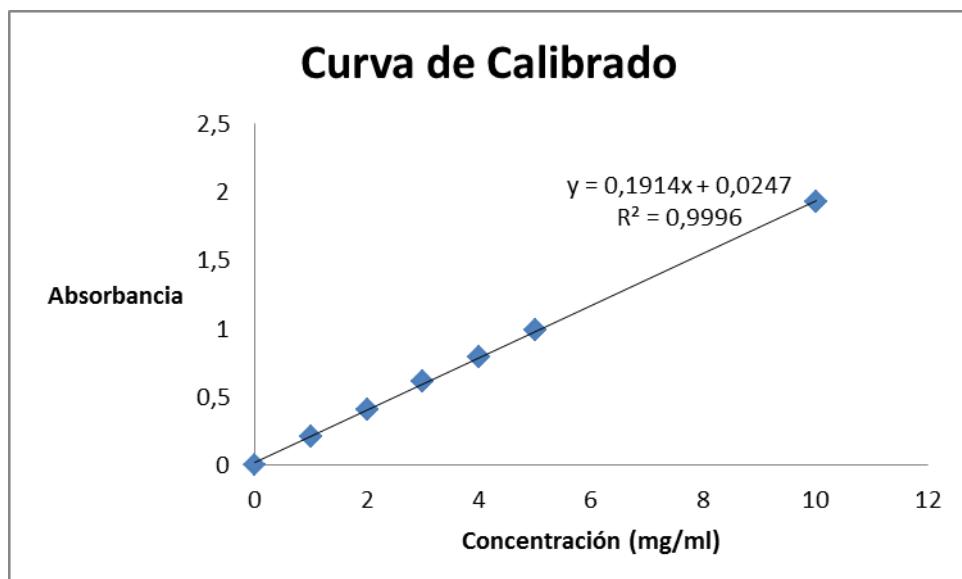


Figura 7: curva de calibrado

2) MÉTODO DE EXTRACCIÓN: SPE

SPE: La Extracción en Fase Sólida (SPE por sus siglas en inglés: Solid Phase Extraction) es la técnica más usual en el tratamiento y concentración de muestras antes de su análisis por HPLC, HPLC/MS, GC o GCMS. Una columna SPE consiste en un lecho adsorbente de partículas gruesas mantenido entre dos discos porosos en un tubo desechable. SPE permite la preconcentración de la muestra con un riesgo mínimo de pérdida o contaminación de la misma. El componente de interés resulta retenido en una fase sólida mientras que los contaminantes de la matriz se eluyen. [11]

ETAPAS:

- **ACONDICIONAMIENTO:** Para activar el adsorbente y los grupos funcionales se hace pasar un volumen de solvente apropiado a través de la columna. Los discos fritados de la columna se solvatan convenientemente. Para adsorbentes hidrofóbicos: metanol o acetonitrilo. Para los hidrofílicos: hexano o cloruro de metileno. Se recomienda usar de 2 a 4 volúmenes de lecho.
- **CARGA:** La muestra se coloca por la parte superior del cartucho.
- **LAVADO:** El lavado permite eliminar compuestos que no son de interés o que podrían interferir manteniendo los analitos en el lecho de adsorbente. Se pueden usar solventes o mezcla de solventes de diferente tipo para mejorar la eficacia del lavado.
- **ELUCIÓN:** Se pasa un solvente adecuado por la columna para eliminar la interacción analito-solvente y así eluir el 100% de los compuestos de interés. El solvente adecuado debe tener la máxima interacción con el analito y una interacción mínima con las demás impurezas, dejándolas en el lecho de adsorbente. El volumen de elución es mejor cuando es el menor posible para así mantener alto el factor de concentración.

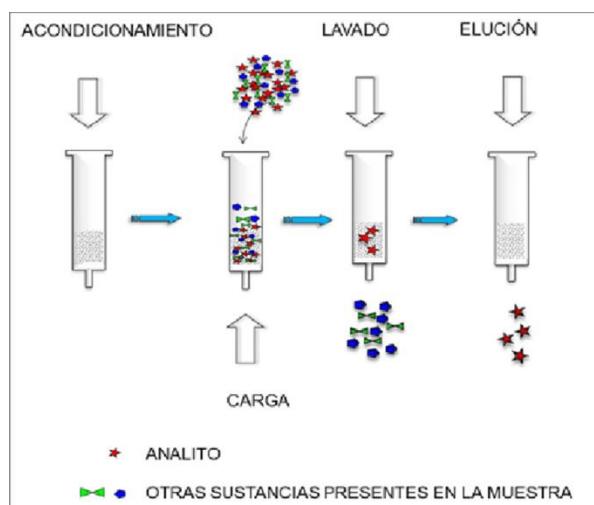


Figura 8: esquema de pasos de SPE

a) PROCEDIMIENTO:

- I. Acondicionamiento de la columna de SPE RP-18 con metanol.

- II. Luego se realizó la carga de la muestra en la columna.
- III. Se realizó un lavado con agua destilada.
- IV. Se eluyó la muestra con metanol.
- V. Se midió en el espectrofotómetro las absorbancias de las soluciones patrones de clorpirifós antes de realizar la extracción y de las muestras recogidas luego de la extracción en fase sólida SPE.



Figura 9: columna RP-18 para SPE

3) ATRIBUTOS DE VALIDACIÓN DEL METODO ANALITICO DE EXTRACCIÓN: SPE

La validación de un método analítico es el procedimiento para demostrar que el método analítico es aceptable para el fin que se pretende, el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.[12][13]

**En este trabajo analizamos la linealidad y la precisión del método que contribuirán juntos con los otros parámetros a una validación a futuro.*

- a) **LINEALIDAD:** La linealidad de un método analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado. Mide el grado en que la respuesta analítica respecto a

la concentración (o cantidad) del analito se ajusta a una función lineal. Debe utilizarse un mínimo de 5 puntos de datos para una evaluación adecuada, que abarcan un intervalo de 0,5 a 1,5 veces la concentración esperada del analito. Cada patrón debe prepararse y analizarse 3 veces, también de blancos. Inspección visual del gráfico y método estadístico (línea de regresión, mínimos cuadrados).[12]

a1) PROCEDIMIENTO: preparar soluciones de clorpirifós de 1, 2, 3, 4 y 6 mg/ml, medir las absorbancias en el espectrofotómetro y luego realizar la curva de calibrado con sus correspondientes parámetros.

a2) Tabla y curva de calibrado de las soluciones de diferentes concentraciones antes de realizar la extracción por SPE:

Concentración (mg/ml)	absorbancia
0	0,0002
0	0,0002
0	0,0002
1	0,1824
1	0,1824
1	0,1822
2	0,3593
2	0,359
2	0,359
3	0,5577
3	0,5574
3	0,5571
4	0,8322
4	0,8319
4	0,8321
6	1,0801
6	1,0801
6	1,0805

Tabla 2: valores de concentraciones y absorbancias de soluciones de clorpirifós para linealidad

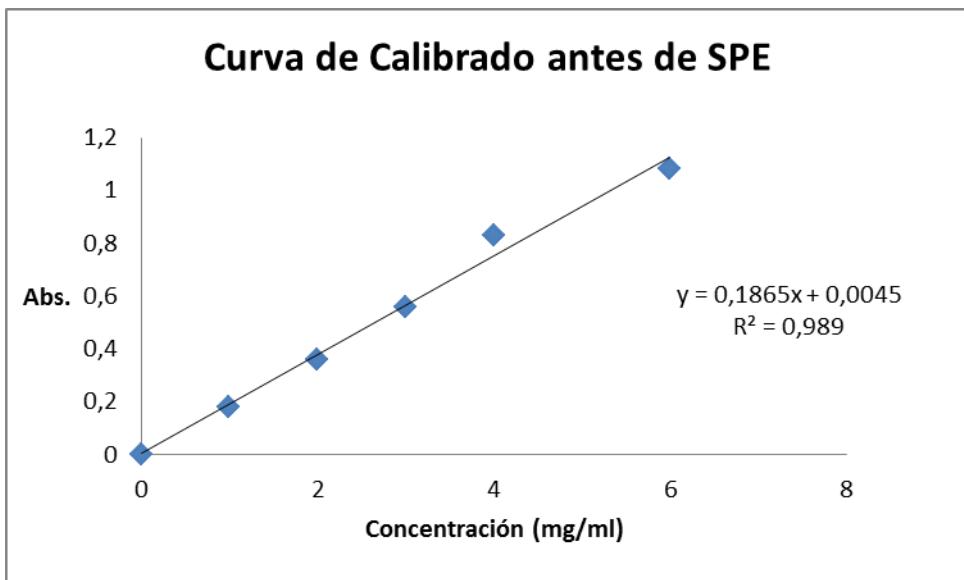


Figura 10: curva de calibrado para linealidad

a3)Tabla y curva de calibrado de las soluciones de diferentes concentraciones después la extracción post SPE:

Concentración(mg/ml)	Abs post SPE	Concentración post SPE (mg/ml)	Porcentaje de recuperación
1	0,104	0,53	53%
1	0,1036	0,53	53%
1	0,1037	0,53	53%
2	0,2088	1,1	55%
2	0,2084	1,09	55%
2	0,2086	1,09	55%
3	0,2861	1,51	50,30%
3	0,2867	1,51	50,30%
3	0,2863	1,51	50,30%
4	0,3837	2,04	51%
4	0,3836	2,03	51%
4	0,3834	2,03	51%
6	0,6539	3,49	58,30%
6	0,6538	3,48	58,30%
6	0,6533	3,48	58,30%

Tabla 3: valores de concentraciones y absorbancias de soluciones de clorpirifós post SPE,porcentajes de recuperación del compuesto

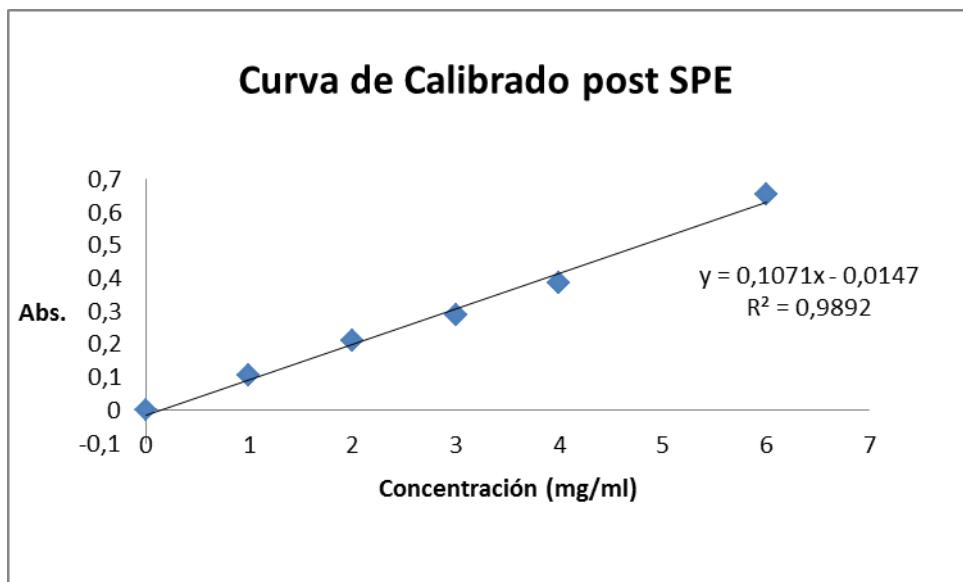


Figura 11: curva de calibrado post SPE para linealidad

b) PRECISIÓN: La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados del ensayo individual cuando el método se aplica repetidamente a varias alícuotas de una muestra homogénea, lo que permite un cálculo estadísticamente válido de la desviación estándar.. La precisión puede ser considerada en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

La repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones operativas en un intervalo de tiempo corto (realizadas por el mismo operario, con el mismo equipo, bajo las mismas condiciones, con el mismo equipo).

La precisión intermedia expresa las variaciones intralaboratorio:diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc.

La reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios(estudios colaborativos).

[12]

b1)PROCEDIMIENTO: para este atributo de la validación se ensayó la repetibilidad, se leyeron las absorbancias por triplicado de 10 ensayos independientes de una solución de 4 mg/ml post SPE.

Muestra	absorbancia	Muestra	absorbancia
spe 1	0,3513	spe 6	0,3486
spe 1	0,3513	spe 6	0,3487
spe 1	0,3513	spe 6	0,3486
spe 2	0,3450	spe 7	0,3271
spe 2	0,3444	spe 7	0,3495
spe 2	0,3445	spe 7	0,3501
spe 3	0,3500	spe 8	0,3505
spe 3	0,3483	spe 8	0,3501
spe 3	0,3500	spe 8	0,3501
spe 4	0,3483	spe 9	0,3500
spe 4	0,3487	spe 9	0,3502
spe 4	0,3492	spe 9	0,3508
spe 5	0,3276	spe 10	0,3500
spe 5	0,3276	spe 10	0,3503
spe 5	0,3275	spe 10	0,3503

Tabla 4: valores de absorbancias de soluciones de clorpirifós de concentración 4mg/ml post SPE de 10 ensayos independientes para Repetibilidad.

b2) DESVIACIÓN ESTÁNDAR

La desviación estándar es un índice numérico de la dispersión de un conjunto de datos (o población). Mientras mayor es la desviación estándar, mayor es la dispersión de la población. La desviación estándar es un promedio de las desviaciones individuales de cada observación con respecto a la media de una distribución. Así, la desviación estándar mide el grado de dispersión o variabilidad. En primer lugar, midiendo la diferencia entre cada valor del conjunto de datos y la media del conjunto de datos. Luego, sumando todas estas diferencias individuales para dar el total de todas las diferencias. Por último, dividiendo el resultado por el número total de observaciones (normalmente representado por la letra "n") para llegar a un promedio de las distancias entre cada observación individual y la media. Este promedio de las distancias es la desviación estándar y de esta manera representa dispersión.[14]

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_i^N (X_i - \bar{X})^2}{N}}$$

- Desviación estándar de la extracción por SPE: 0,00773907

4) SEGUNDA PARTE: ANÁLISIS DE SOLUCIÓN DE CLORPIRIFÓS COMERCIAL EN MUESTRA DE CARNE DE PACÚ ARROCERO.

MUESTRA DE PACÚ ARROCERO: el pacú arrocero se pueden encontrar en locales comerciales bajo la forma de pescado entero, filetes, Nuggets, medallones. Para este trabajo se utilizó filetes de pacú arrocero, el cual se trituró para proceder a los ensayos siguientes.



Figura 12: muestras comerciales de pacú arrocero.



Figura 13: trituración de la carne de pacú arrocero

Se procedió a sobreagregar a la carne de pacú arrocero las soluciones de clopirifós en concentraciones 2, 4 y 6 mg/ml. Luego se realizó la extracción por SPE y posterior medición por espectrofotometría de estas soluciones.

En paralelo se midió las absorbancias pre y post SPE del “agua de pescado” que sería la solución obtenida de la trituración de la carne de pacú arrocero. Esta muestra es el pacú arrocero a la venta en comercios.

a1) PROCEDIMIENTO

- I. Preparación de las soluciones de clorpirimifós de concentraciones de 2, 4 y 6 mg/ml.
- II. Medición de estas soluciones por espectrofotometría.
- III. Se sobreagregaron las soluciones de clorpirimifós a 3 porciones de 1 gramo de pacú arrocero triturado. Se midieron las absorbancias de las soluciones recuperadas post SPE, como así también del agua de pescado pre y post SPE (muestra sin sobreagregar).



Figura 14: muestras de pacú arrocero con sobreagregado de soluciones de clorpirimifós.

a2) Tabla con los valores de las mediciones de las soluciones de diferentes concentraciones antes de realizar la extracción por SPE, luego de realizar la extracción por SPE del sobreagregado a la carne de pacú arrocero, el agua del pacú sin sobreagregado antes y después de la extracción por SPE.

Los valores fueron calculados utilizando la ecuación de la recta de la curva de calibrado

Concentración(mg/ml)	Abs	Abs post SPE	Concentración post SPE (mg/ml)	Porcentaje de recuperación
2	0,3904	0,2574	1,36	68%
2	0,4035	0,2803	1,48	74%
2	0,4033	0,2593	1,48	74%
4	0,8001	0,5541	2,94	74%
4	0,7986	0,5436	2,89	72%
4	0,7899	0,5449	2,89	72%
6	1,0774	0,6675	3,55	59,00%
6	1,0733	0,6791	3,62	60,30%
6	1,0829	0,6698	3,57	59,50%
agua de pescado	0,1521	0,1242	0,79 (antes SPE) 0,64(post SPE)	81%
agua de pescado	0,16	0,1131	0,83 (antes SPE) 0,58(post SPE)	69%
agua de pescado	0,1523	0,1229	0,79 (antes SPE) 0,63(post SPE)	79%

Tabla 5: valores de concentraciones y absorbancias de soluciones de clorpirifós y agua de pescado post SPE, porcentajes de recuperación del compuesto

5) HPLC

La cromatografía líquida (LC o HPLC, por sus siglas en inglés High Performance Liquid Cromatography), es una técnica separativa muy importante, ya que la mayoría de los compuestos no son lo suficientemente volátiles como para que se pueda aplicar la cromatografía de gases. En esta técnica la fase móvil es un líquido al que se le aplica una presión elevada para forzarlo a que pase a través de una columna que contiene partículas muy finas, consiguiéndose así separaciones de gran resolución. El gran poder de la cromatografía líquida reside en la combinación de un amplio intervalo de posibles propiedades para la fase móvil, junto con la elección de numerosos tipos de fases estacionarias, significativamente diferentes, así como una amplia variedad de detectores. Otras razones de la popularidad de esta técnica son su elevada sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria (por ejemplo: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, fármacos, plaguicidas, etc.).

Los diferentes tipos de cromatografía líquida se pueden clasificar atendiendo al tipo de interacción que se produce entre la fase estacionaria y el soluto. Según este criterio se denominan cromatografía de fase normal, de fase reversa, de intercambio iónico y de filtración en gel (también denominada de exclusión o permeabilidad en gel). Algunas fases estacionarias se diseñan para que interaccionen con grupos químicos específicos. La cromatografía en la que la fase estacionaria presenta puntos activos para determinados grupos se denomina de afinidad.

En este trabajo se utilizó la cromatografía líquida en fase reversa. En este caso la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. Se usan fundamentalmente dos tipos de fases estacionarias, basadas en los grupos orgánicos: -C8H17, y -C18H37. De ellos, la cadena de 18 carbonos (grupo octadecilo) es la más común (ODS ó C18). Estos grupos orgánicos ligados producen un efecto similar al que tendría una capa extremadamente fina de disolvente orgánico sobre la superficie de las partículas de sílice del soporte. De esta manera la

distribución de los solutos entre la película superficial y la fase móvil se parece más a una extracción líquido-líquido. Cuanto más larga es la cadena carbonada, la capa ligada se vuelve más orgánica e interacciona con más fuerza con los solutos que se disuelven en fases orgánicas. La cromatografía en fase reversa es relativamente popular ya que los picos tienden a ser agudos y simétricos.

TIEMPO DE RETENCIÓN (tR): En cromatografía líquida y cromatografía de gases, el tiempo de retención, tR, se define como el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición de la respuesta máxima. Se puede usar tR como un parámetro para identificación. Los tiempos de retención cromatográficos son característicos de los compuestos que representan, pero no son únicos. La coincidencia de los tiempos de retención de una muestra y de una sustancia de referencia puede usarse como un criterio parcial en la construcción de un perfil de identidad, pero es insuficiente por sí misma para establecer la identidad. Los tiempos de retención absolutos de un compuesto dado varían de un cromatograma al siguiente. [15]

PRUEBAS CON HPLC : en la segunda instancia del trabajo se procedió a analizar las soluciones por cromatografía

- Cromatógrafo HPLC Agilent 1120 Compact con bomba isocrática, lavador de sellos y detección UV.
- Columna: columna de C18 (4,6 × 250 mm)
- Software: EZChrome Elite Software para adquisición, control y evaluación de datos cromatográficos.
- Fase móvil acetonitrilo + KH₂PO₄ 0,03M
- pH=2,5
- longitud de onda:229nm
- Columna RP-18 para SPE
- Filtro 100 Syring Filters de Agilent Technologies para inyectar la solución al equipo de HPLC.

Se realizaron corridas de 10 y 15 minutos en HPLC de las siguientes soluciones:

- 1) 5 mg/mL
- 2) 2,5 mg/mL
- 3) 10 mg/mL
- 4) muestra luego de la extracción de SPE
- 5) De H₂O d de lavado
- 6) Elución con metanol

Se obtuvieron picos similares en los cromatogramas y se corresponden al diluir o concentrar las soluciones. Los resultados son preliminares y se pretende continuar a futuro con estos ensayos.

- **Ejemplo : Clorpirifós 5mg/ml**
- **Tiempo de retención: 2,48 minutos**

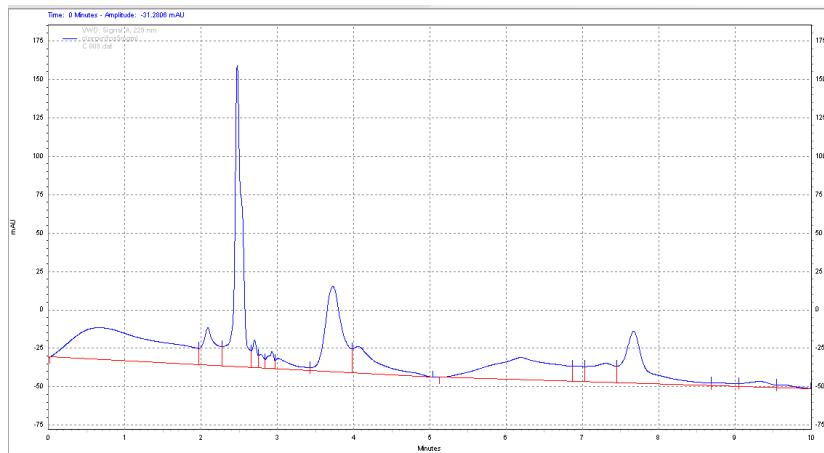


Figura 15: cromatograma de HPLC

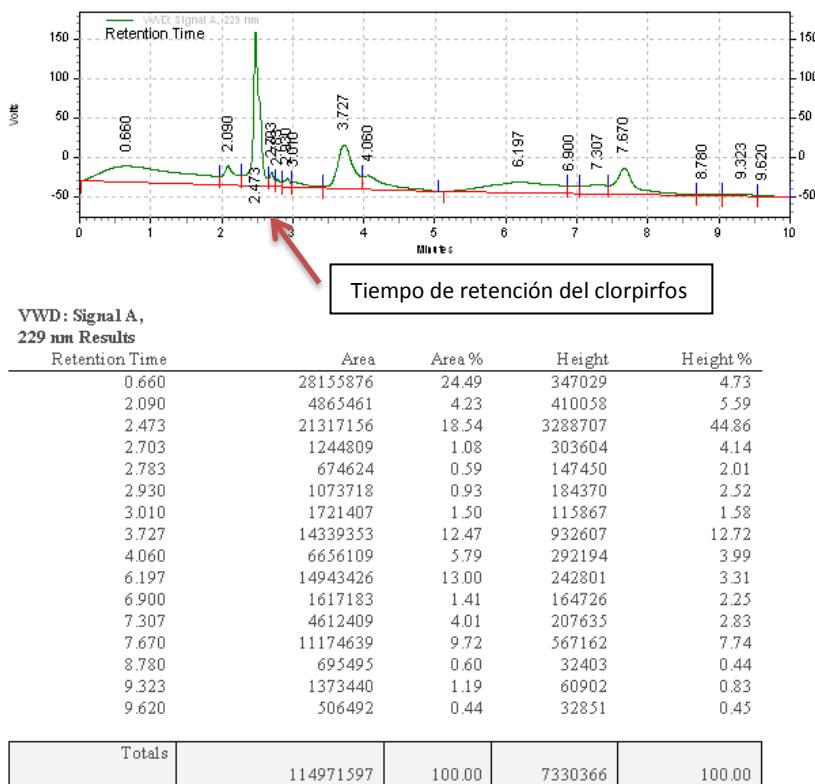


Figura 16: cromatograma de HPLC con tiempos de retención y áreas de los picos

OBSERVACIONES DE LOS INCONVENIENTES

Debido a desperfectos en la bomba binaria del HPLC el mismo quedó sin poder ser utilizado durante el año 2021 hasta poder ser arreglado, razón por la cual no pudieron ser completadas las determinaciones planteadas para este proyecto. Es por ello que se decidió completar el estudio con espectrofotometría-UV.

Con respecto a la espectrofluorimetría por razones de tiempo debido a la pandemia no se pudo introducir una nueva metodología.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La espectrofotometría es un método de medición relativamente sencilla de realizar por un operario capacitado para tal fin en cualquier laboratorio de mediana complejidad que cuente con espectrofotómetro, por lo cual la detección y medición del agroquímico clorpirifós podría llevarse a cabo en zonas donde no se cuente con instrumental mas sofisticado y costoso.

El método validado ha permitido determinar la concentración de clorpirifós en el pacú arrocero, al obtener concentraciones muy bajas de este agroquímico en la muestra menores a 1 mg/ml se considera un nivel de trazas.

Se obtuvieron porcentajes de recuperación del compuesto de interés (en solución acuosa como así también por método de sobreagregado en la carne del pacú arrocero) mayores al 50% hasta un 79% utilizando la técnica analítica de extracción por SPE y posterior medición por espectrofotometria. Comparando con métodos más complejos la bibliografía reporta porcentajes de recuperación cercanos al 100% con Cromatografia de alta presión como metodología de cuantificación[16]

En cuanto a los atributos de validación se han desarrollado la linealidad y la precisión. En la linealidad se pudo observar la relación directamente proporcional o relación lineal de absorbancias y concentraciones en el rango estudiado, los cuales permitieron obtener ecuaciones para el cálculo de concentraciones. Para la precisión en este caso se ensayó la repetibilidad de 10 ensayos independientes medidas por triplicado (n=30), obteniéndose en todos un valor similar y un coeficiente de variación bajo el cual refleja la minima dispersión de los datos obtenidos.

En trabajos anteriores realizados como alumna becaria de investigación se utilizaron técnicas de extracción liquido-liquido para separación del fármaco Metronidazol, los cuales empleaban mayores volúmenes de solventes para lograr la separación con la consecuente desventaja de ser más costosas y de mayor contaminación ambiental por los residuos que ocasionaba, es por ello que la extracción por SPE ofrece una gran ventaja frente a extracción liquido-liquido por ampolla de decantación.

Si bien los resultados obtenidos en este trabajo de investigación constituyen una limitación si se comparan con métodos analíticos de mayor complejidad, se puede decir que sirven de base para estudios posteriores, como así se ha comenzado a realizar bajo la presente Práctica Electiva mediante la familiarización del uso del HPLC y logrando resultados peliminares.

CONCLUSIÓN

Se lograron cumplir los objetivos planteados en el plan de trabajo, los resultados obtenidos bajo la presente Práctica Electiva servirán como una base muy valiosa para estudios posteriores con agroquímicos.

Durante el presente trabajo se adquirieron mayores destrezas en el laboratorio, se logró profundizar los conocimientos en el área de instrumental, búsqueda bibliográfica, como así también en investigación básica y aplicada.



Dra. Celina M. Monzón

Directora Práctica Electiva



Nahiara Tamara Mendez

Alumna

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] N.F. Schenone, L. Vackova, A.F. Cirelli, Fish-farming water quality and environmental concerns in Argentina: A regional approach, *Aquac. Int.* 19 (2011) 855–863. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9404-x>.
- [2] M. Halwart, Trends in Rice-Fish Farming, (2019).
- [3] L. Luchini, Ministerio de Agricultura., Piscicultura: El caso del “sistema de rotacion” arroz-pacu en el pais, 2017.
- [4] B. Sarkar, R. Mukhopadhyay, A. Mandal, S. Mandal, M. Vithanage, J.K. Biswas, Sorption and desorption of agro-pesticides in soils, LTD, 2020. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-103017-2.00008-8>.
- [5] S.O. Duke, Glyphosate: Environmental fate and impact, *Weed Sci.* 68 (2020) 201–207. <https://doi.org/10.1017/wsc.2019.28>.
- [6] C.M. Benbrook, Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally, *Environ. Sci. Eur.* 28 (2016) 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>.
- [7] S.Sommantico. Cómo es la producción de arroz y pacú, una tendencia que crece en el NEA extraido de <https://www.infocampo.com.ar/como-es-la-produccion-de-arroz-y-pacu-una-tendencia-que-crece-en-el-nea/>
- [8] Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades. Chlorpyrifos https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts84.html
- [9] Agro Activo. Extraído de <https://agroactivo.com/producto/sanidad-vegetal-alimentos-saludables/clorpirifos-rafaga/>
- [10] N. Diaz. A. Ruiz y col. Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Extraído de: https://www.uco.es/dptos/bioquimicabiolmol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETRIA.PDF
- [11] Cuantificación de dimetoato en aguas de riego. Preconcentración por extracción en fase sólida (SPE). CURSO DE POSGRADO: HPLC en el Desarrollo Analítico Res. 938/12 CD

[12] Validación de métodos analíticos . Buenas Prácticas para Laboratorios Nacionales de Control Farmacéutico. Anexo 3 informe 36, 2002
https://www.paho.org/hq/dm/documents/2008/13_Modulo_VALIDACIoN_de_Metodos_Fisicoqcos.pdf

[13] D. Harris._Análisis Químico Cuantitativo.. Grupo Editorial Iberoamérica. 3er edición

[14] Validación de métodos analíticos. Extraído de:
https://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/flip_pages/Farmacopea_Vol_I/files/assets/basic-html/page440.html

[16] A. Naser_.D.M. Ferré y col. Determinación de clorpirifós por cromatografía de alta presión-detector UV. Revista Jornadas de Investigación. UMaza.2015.ISSN 2314-2170

[15] Introducción al HPLC - Método del Patrón Interno- apunte de Quimica Analitica Instrumental-Facena.