

UCH-FC
C. Ambiental
E 774
C.1



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**“DETERMINACIÓN DE GLIFOSATO Y ÁCIDO AMINOMETILFOSFÓNICO
MEDIANTE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN CON
9-FLUORENILMETILCLOROFORMIATO (FMOC-CL) Y DETECCIÓN POR
HPLC-FLUORESCENCIA EN MATRICES DE SUELOS”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de

Químico Ambiental

María José Espina Ávila

Director de Seminario de Título: Dra. María Estrella Báez C.

Co Director: Dra. Jeannette Espinoza G.

Profesor Patrocinante: M.Cs. Sylvia Copaja C.

Marzo de 2013

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN DE SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Candidata:

María José Espina Ávila

**“DETERMINACIÓN DE GLIFOSATO Y ÁCIDO AMINOMETILFOSFÓNICO
MEDIANTE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN CON
9-FLUORENILMETILCLOROFORMIATO (FMOC-CL) Y DETECCIÓN POR
HPLC-FLUORESCENCIA EN MATRICES DE SUELOS”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Químico Ambiental

COMISIÓN DE EVALUACIÓN

Dra. María Estrella Báez C.

Director Seminario de Título

M.Cs. Sylvia Copaja C.

Profesor Patrocinante

Dr. Edwar Fuentes P.

Corrector

M.Cs. Hector Bravo V.

Corrector

Este bloque contiene las firmas manuscritas de los miembros de la Comisión de Evaluación y el sello circular de la Facultad de Ciencias, Biblioteca Central, Universidad de Chile. Las firmas corresponden a María Estrella Báez C., Sylvia Copaja C., Edwar Fuentes P., y Hector Bravo V. El sello es circular y contiene el texto "FACULTAD DE CIENCIAS", "BIBLIOTECA CENTRAL" y "U. DE CHILE" rodeado por estrellas.

Santiago de Chile, Marzo de 2013

Reseña



María José Espina Ávila desarrolló interés por distintas áreas durante su enseñanza escolar, lo que se tradujo en dudas sobre su real vocación, incluso días previos a la postulación para ingresar a una carrera universitaria. Sin embargo, la motivación por la ciencia inclinó la decisión hacia la carrera de Química Ambiental en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, donde ingresó a la escuela de pregrado el año 2005. Estudiar esta carrera lo visualizaba como un gran desafío, principalmente por dudas sobre su desarrollo profesional y por no ser una carrera tradicional.

Los últimos años en la Universidad trajeron consigo los ramos de carrera, donde el enfoque es más profesional, en esta instancia fue que María José encontró su verdadera vocación principalmente en el área de gestión ambiental y contaminación de suelos. Por ende, su unidad de investigación se enfocó en suelos contaminados por metales pesados, y fue realizado en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

El interés y conocimientos adquiridos en el área de suelos fueron aumentando, por lo que no dudó en aceptar y trabajar arduamente en un seminario de título en este tema, el cual se denominó “Análisis de glifosato y su metabolito AMPA en suelos mediante extracción asistida por microondas y determinación por HPLC-FLD”,

realizado en el laboratorio de Química Vegetal, departamento de Química Inorgánica y Analítica de la Universidad de Chile

La vida universitaria no fue fácil, muchas horas de estudio y de desvelo, pero el objetivo a alcanzar era claro: titularse como Químico Ambiental, aunque esto implicara grandes sacrificios y esfuerzos. Pero también vivió experiencias únicas, además de adquirir una sólida formación académica, le entregó un grupo de amigas que quedaran para toda la vida.

En la actualidad María José Espina es una profesional completa con las herramientas suficientes para enfrentarse como profesional al exigente mundo laboral, estas fueron las huellas dejadas por la Facultad de Ciencias y que perdurarán por el resto de su vida.



***“Dedico este seminario de título a mi hermosa familia,
gracias por su apoyo y amor incondicional”***



“Lo importante es que tú seas feliz”

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi padre, mi madre y mi hermano, pilar fundamental en mi vida, por su apoyo y amor incondicional. Gracias por estar siempre presente y por concederme la oportunidad ser una profesional y a mi pequeña por acompañarme, siempre, en esas largas noches de estudio.

Quiero agradecer a mis compañeros de universidad, en especial a las que se convirtieron en mis amigas Ale, Yiyi, Dalila, Marce y Tamara porque juntas fuimos capaces de superar muchas barreras. Gracias por su apoyo, sus locuras que tanto me hicieron reír y por estar siempre ahí cuando las necesite.

A las personas que conocí en el desarrollo de mi seminario de título: Luis, Camila, Masiel pero especialmente a mi amiga Francis Alarcón que con sus consejos y apoyo me ayudo concluir esta última etapa de mi vida universitaria.

A todas las personas que hicieron posible la realización de este seminario de Título, especialmente a la Dra. María Estrella Báez, mi directora de tesis, por su paciencia y enseñanzas que me ayudarán a enfrentar la vida. A los profesores Dr. Edward Fuentes, por su amabilidad y buena disposición y Dra. Jeannette Espinoza por el apoyo en el desarrollo de mi trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Hipótesis.....	12
1.2. Objetivos	12
1.2.1. Objetivo General	12
1.2.2. Objetivos específicos	12
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
2.1. Materiales	13
2.2. Suelos	14
2.3. Métodos.....	16
2.3.1. Método cromatográfico.....	16
2.3.2. Diseño exploratorio	16
2.3.2.1 Estudios complementarios previos a la optimización.....	19
2.3.3. Optimización	20
2.3.4. Parámetros analíticos instrumentales.....	22
2.3.5. Aplicación del método de derivatización.....	24
2.3.5.1 Estudio de interferencias de matriz con electrolito soporte.....	24
2.3.5.2 Estudio preliminar de adsorción.....	24
2.3.5.3 Isotermas de adsorción.....	25
2.3.6. Estudio preliminar de Extracción	26
III. RESULTADOS	31
3.1. Método cromatográfico	31
3.2. Diseño Exploratorio.....	36
3.2.1. Estudios complementarios previos a la optimización.....	40
3.3. Optimización.....	43
3.4. Parámetros analíticos instrumentales.....	48
3.4.1. Linealidad y Sensibilidad.....	48
3.4.2. Límite de Detección y Cuantificación	50

3.4.3. Límite de Detección y Cuantificación experimental	52
3.5. Aplicación del método de derivatización	52
3.5.1. Estudio de interferencias de matriz con electrolito soporte	53
3.5.2. Estudio preliminar de adsorción.....	55
3.5.3. Isotermas de adsorción.....	56
3.6. Estudio preliminar de Extracción	61
3.6.1. Diseño exploratorio	61
IV. CONCLUSIONES	68
V. REFERENCIAS.....	70
VI. ANEXOS	73
Anexo 1. Método cromatográfico	74
Anexo 2. Limpieza de la solución para la eliminación del exceso de FMOC-Cl..	75
Anexo 3. Estudio de interferencia de matriz con electrolito soporte	75
Anexo 4. Estudio preliminar de adsorción.....	76
Anexo 5. Extracción	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los suelos	14
Tabla 2. Gradiente de la fase móvil	16
Tabla 3. Factores y niveles del diseño experimental	17
Tabla 4. Matriz codificada del diseño experimental	17
Tabla 5. Factores y niveles del diseño experimental factorial multivariado.....	21
Tabla 6. Matriz codificada del diseño experimental factorial multivariado	21
Tabla 7. Factores y niveles del diseño experimental factorial	27
Tabla 8. Matriz codificada en el diseño experimental factorial de la extracción de los analitos desde el suelo	27
Tabla 9. Gradiente de la fase móvil ACN:acetato de sodio con ácido acético	33
Tabla 10. Gradiente de la fase móvil ACN:agua ajustada a pH 2,53 con H ₃ PO ₄	33
Tabla 11. Gradiente de la fase móvil ACN:Buffer borato pH 8	33
Tabla 12. Gradiente de la fase móvil ACN:Buffer borato pH8	33
Tabla 13. Parámetros cromatográficos	35
Tabla 14. Matriz decodificada y respuestas cromatográficas del estudio exploratorio...	37
Tabla 16. Matriz decodificada y respuestas cromatograficas en el estudio exploratorio multivariado	43
Tabla 17. Parámetros analíticos	49
Tabla 18. Parámetros analíticos	51
Tabla 19. Parámetros analíticos instrumentales	52

Tabla 20. Rendimiento de la reacción de derivatización en estudio de interferencias de electrolito soporte y de la matriz suelo.....	54
Tabla 21. Cantidad de analito adsorbido en el suelo.....	55
Tabla 22. Valores de coeficientes de Freundlich (K_f y $1/n$) y coeficiente de carbono orgánico para la adsorción de los analitos en los suelos (K_{oc}).....	57
Tabla 23. Matriz decodificada y respuestas del estudio exploratorio.....	63
Tabla 24. Porcentaje de recuperación según tratamiento realizado.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plaguicidas vendidos según su clasificación Total País, año 2008	3
Figura 2. Venta de GPS entre los años 2001 y 2008 en Chile (SAG).....	3
Figura 3. Estructura química de GPS y su principal metabolito (AMPA)	4
Figura 4. Disociación de la molécula de GPS.....	5
Figura 5. Disociación de la molécula de AMPA.....	6
Figura 6. Reacción de derivatización	10
Figura 7. Metodología de extracción de GPS y AMPA asistida por microondas.....	30
Figura 8. Cromatograma tipo con detector DAD.....	31
Figura 9. Espectros UV de los compuestos: peak 7,003 corresponde a GPS, peak 7,387 corresponde a AMPA y peak 9,770 corresponde a FMOC-Cl.....	32
Figura 10. Cromatograma tipo con detector de fluorescencia.....	35
Figura 11. Cromatograma obtenido para las concentraciones correspondientes al límite de detección: 0,02 µg/mL y 0,01 µg/mL para GPS y AMPA respectivamente.....	36
Figura 12. Carta de Pareto estandarizada para GPS.....	39
Figura 13. Carta de Pareto estandarizada para AMPA.....	39
Figura 14. Estudio Cinético para GPS.....	40
Figura 15. Estudio Cinético para AMPA.....	41
Figura 16. Superficie de respuesta optimización GPS	46
Figura 17. Superficie de respuesta optimización para AMPA.....	46
Figura 18. Metodología para la determinación de GPS y AMPA por HPLC-FLD	47
Figura 19. Curva de calibración para GPS.....	48

Figura 20. Curva de calibración para AMPA	49
Figura 21. Curva de calibración para GPS.....	50
Figura 22. Curva de calibración para AMPA	51
Figura 23. Isoterma GPS en suelo Collipulli	58
Figura 24. Isoterma AMPA en suelo Collipulli	58
Figura 25. Isoterma GPS en suelo Comalle	59
Figura 26. Isoterma AMPA en suelo Comalle.....	59
Figura 27. Isoterma GPS en suelo Santa Luisa	60
Figura 28. Isoterma AMPA suelo Santa Luisa.....	60
Figura 29. Carta de Pareto Estandarizada para GPS	64
Figura 30. Carta de Pareto Estandarizada para AMPA	64

LISTA DE ABREVIATURAS

GPS: Glifosato

AMPA: Acido aminometilfosfonico

Fmoc-Cl: 9-fluorenilmetilcloroformiato

RESUMEN

Glifosato (N-(fosfonometil) glicina, GPS) es actualmente el herbicida más utilizado tanto a nivel nacional como mundial, en agricultura, silvicultura y uso urbano. Su principal metabolito es el Ácido Aminometilfosfónico (AMPA) que se produce principalmente por biodegradación. Ambas moléculas presentan propiedades químicas y físicas similares: son poco volátiles, polares e insolubles en solventes orgánicos. La cuantificación de GPS y AMPA a niveles residuales es muy compleja debido a sus características químicas, en particular la detección por fluorescencia no puede ser aplicada sin una reacción previa de derivatización por la ausencia de grupos funcionales fluorofóros.

En este seminario de título se estudió, optimizó y validó un método para la determinación analítica de GPS y AMPA en matrices de suelo a partir de una reacción de derivatización con 9-fluorenilmetilcloroformiato (FMOC-Cl) y el uso de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector de fluorescencia. Además se aplicó el método en un estudio de adsorción de ambos compuestos en suelos a través de isothermas y en un estudio preliminar de extracción por medio de microondas.

Las condiciones cromatográficas óptimas para la separación y cuantificación de GPS y AMPA se establecieron utilizando una columna YMC-Pack Pro C18, S-5 μm de 250x4,6 mm I.D. y fase móvil CH_3CN :Buffer borato pH 8, a un flujo de 1,2 mL/min y una temperatura de columna de 35°C.

Se estableció la influencia de cinco factores en el rendimiento de la reacción de derivatización a través de un diseño factorial de tipo exploratorio y, a partir de los resultados obtenidos, se determinaron las condiciones óptimas a partir de un diseño factorial multinivel con tres factores experimentales: tiempo de reacción, concentración de FMOC-Cl y relación entre la concentración de AMPA y GPS. Los resultados de ambos tipos de diseño fueron analizados mediante ANOVA.

Para una curva de calibrado entre 0,2 y 1,0 $\mu\text{g/mL}$, el método propuesto tiene una linealidad de 0,964 para GPS y 0,989 para AMPA definidos por la relación entre la pendiente y su desviación estándar ($R^2 \geq 0,99$ para ambos analitos) con un límite de detección de 0,025 y 0,011 $\mu\text{g/mL}$ y límite de cuantificación de 0,083 y 0,039 $\mu\text{g/mL}$ para GPS y AMPA, respectivamente.

Como una primera aplicación del método de derivatización se realizó un estudio de adsorción de GPS y AMPA en tres suelos provenientes de la VI, VII y IX Región del país para los cuales se establecieron las constantes K_f y $1/n$ del modelo empírico de Freundlich.

Además se realizó un estudio exploratorio de los factores que influyen en la eficiencia de extracción de GPS y AMPA desde suelos utilizando microondas como fuente de energía. Este estudio preliminar es la base de estudios posteriores de optimización y validación del método para su aplicación en diferentes tipos de suelos.

ABSTRACT

Glyphosate (N-(phosphonomethyl) glycine, GPS) is the most widely used herbicide in agriculture, forestry and urban activities both in Chile and globally. Its main metabolite, the aminomethylphosphonic acid (AMPA), is produced principally by biodegradation. Both molecules have similar chemical and physical properties: they are poorly volatile, polar and insoluble in organic solvents. Quantification of GPS and AMPA at residual levels is very complex due to these chemical properties, including the fluorescence detection which cannot be applied without a previous derivatization reaction due to the absence of functional fluorophore groups.

In this seminar a method for the analytical determination of GPS and AMPA in soil derived matrices based on the derivatization reaction with 9-Fluorenylmethyl chloroformate, (FMOC-Cl) associated with High Performance Liquid Chromatography and fluorescence detection was studied. Optimal conditions for the maximum yield were established and subsequently the method was validated. Finally it was applied in two kinds of works: an adsorption study through isotherms for both compounds and a preliminary study of an extraction method assisted by microwaves.

The optimal chromatographic conditions for the appropriate resolution and quantification of GPS and AMPA were established by using a YMC-Pack Pro C18 column (S-5 μ m, 12 nm of 250x4, 6 mm ID) and CH₃CN: borate buffer pH 8 as the mobile phase at a flow 1.2 mL/min. The column temperature was 35 ° C.

The influence of five factors on the yield of the reaction of derivatization was established through an exploratory factorial design, and according to the results, optimal

conditions were determined from a multi factorial design with three experimental factors: reaction time, concentration of FMOC-Cl and the concentration ratio between AMPA and GPS. The results of both designs were analyzed using ANOVA.

For a calibration curve between 0.2 and 1.0 mg / mL, the proposed method has a linearity of 0.964 to 0.989 for AMPA GPS and defined by the relationship between the slope and its standard deviation ($R^2 \geq 0.99$ for both analytes) with a detection limit of 0.025 and 0.011 mg / mL and quantification limit of 0.083 and 0.039 mg / mL for GPS and AMPA, respectively.

As a first application of the derivatization method, a study related to the adsorption of GPS and AMPA on three Chilean soils from VI, VII and IX Region was carried out. The constants K_f and $1/n$ from the empirical Freundlich model were established.

Furthermore an exploratory factorial design was done for establishing the influence of different factors on the extraction efficiency of GPS and AMPA from soils by using an extraction method assisted by microwave energy. This preliminary study constitutes the base for the optimization and validation analytical steps and further application in different class of soils.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el ser humano ha consumido de manera irracional y exponencial los distintos recursos naturales para poder satisfacer sus necesidades. El suelo es un recurso muy explotado por los cultivos para alcanzar una mayor producción de alimentos, en donde el uso de pesticidas es una práctica habitual, debido a la amenaza de diversas plagas en la producción agrícola.

Según el Decreto Ley N° 3557 de 1980 del Ministerio de Agricultura de Chile un plaguicida es un compuesto químico, orgánico o inorgánico, o sustancia natural que se utilice para combatir malezas, enfermedades o plagas, potencialmente capaces de causar perjuicios en organismos u objetos, como por ejemplo hongos, insectos y malezas.

Los plaguicidas se clasifican según su acción específica y entre los más importantes se encuentran los insecticidas (control de insectos), fungicidas (control de hongos) y los herbicidas; estos últimos son utilizados para controlar las malezas que compiten con los cultivos por recursos vitales como luz, agua o nutrientes.

En este seminario de título se estudió y validó una metodología para la determinación analítica de glifosato y su principal metabolito para ser aplicada en matrices ambientales. Para ello se utilizaron herramientas quimiométricas como son un diseño factorial de tipo exploratorio (“Screening”) y un diseño experimental factorial multinivel, para la optimización del método.

Glifosato (N-(fosfonometil) glicina, IUPAC) es un herbicida que se comercializa con el nombre de ROUNDUP. Ingresó al mercado a través de la compañía Monsanto a principios de los años 70 y se ubicó como uno de los plaguicidas más utilizados a nivel mundial a fines de la década de los noventa. Se utiliza en agricultura y silvicultura para la eliminación de hierbas y arbustos anuales y perennes. Es no selectivo, de amplio espectro y acción sistémica, es decir su vía de absorción en las plantas es por las hojas y tallos propagándose luego al resto de ella (Tomlin, 2003). Su grado de efectividad es muy alto debido a que las plantas lo metabolizan muy lentamente o no lo degradan. El principal producto de degradación de GPS encontrado en plantas, suelo y agua es AMPA (Freuze y col, 2007).

En Chile los herbicidas representan 13,9% del total de plaguicidas vendidos según el último informe publicado por el SAG (2008) concentrándose el mayor consumo en la VI región con una venta de 21.849 toneladas. Glifosato es el plaguicida más utilizado en Chile con un total vendido de 2.863 toneladas, correspondiente al 37,57% del total de ventas de herbicidas a nivel nacional. En la figura 1 se muestra la venta de plaguicidas vendidos como el Total País y en la figura 2 se observa la evolución de las ventas de GPS entre los años 2004 y 2008 (gráfico realizado a partir de las cifras publicadas por SAG).

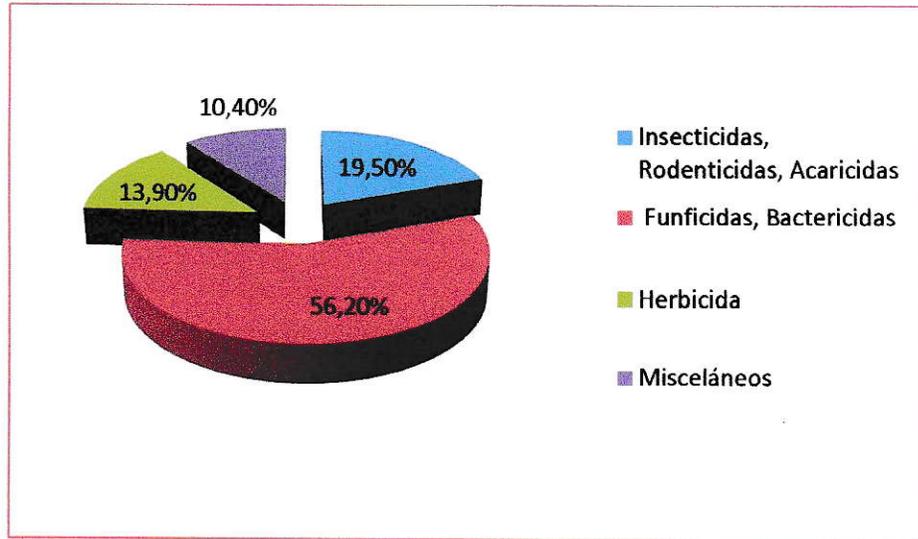


Figura 1. Plaguicidas vendidos según su clasificación Total País, año 2008

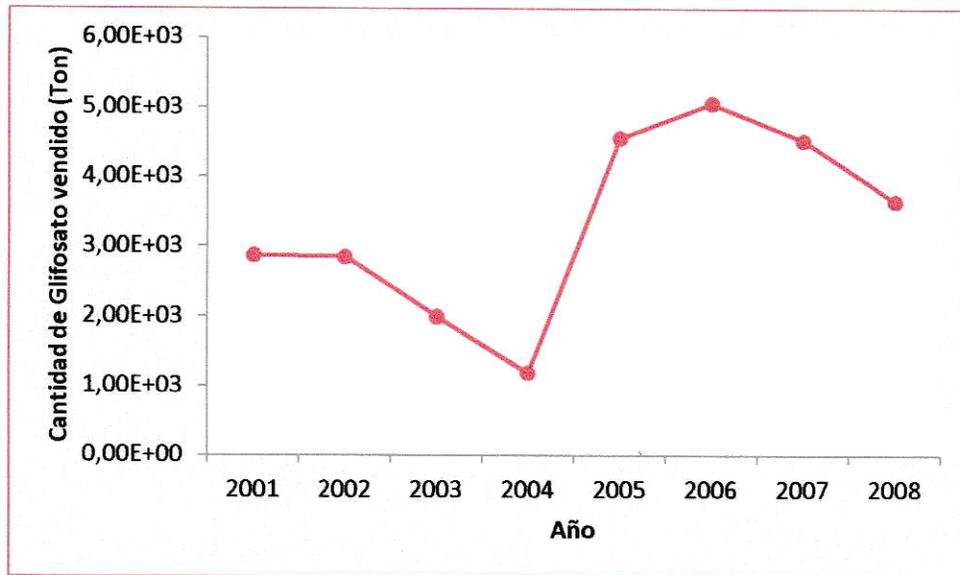


Figura 2. Venta de GPS entre los años 2001 y 2008 en Chile (SAG)

La molécula de GPS posee tres grupos funcionales polares: carboxilato, amino y fosfonato, los que estarán positiva o negativamente cargados de acuerdo al pH de la solución. La molécula de AMPA solo posee los grupos funcionales fosfonato y amino; a pesar de no tener el grupo carboxilato, retiene muchas de las propiedades físicas del compuesto parental. En la figura 3 se muestran las estructuras químicas de ambas moléculas y en las figuras 4 y 5 se indican las vías de disociación y los correspondientes valores de pKa informados en la literatura (Llasera y col, 2005 y Miles and Moye, 1988). Glifosato es muy soluble en agua (12 g/L a 25°C) e insoluble en compuestos orgánicos. Tiene una baja presión de vapor (0,04 mPa) y presenta un valor de $K_{OW} = 2,6 \times 10^{-5}$ (Tomlin, 2003).

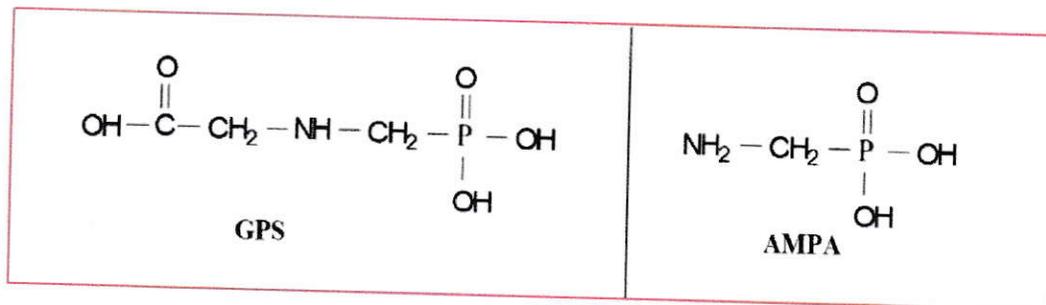


Figura 3. Estructura química de GPS y su principal metabolito (AMPA)

pKa GPS

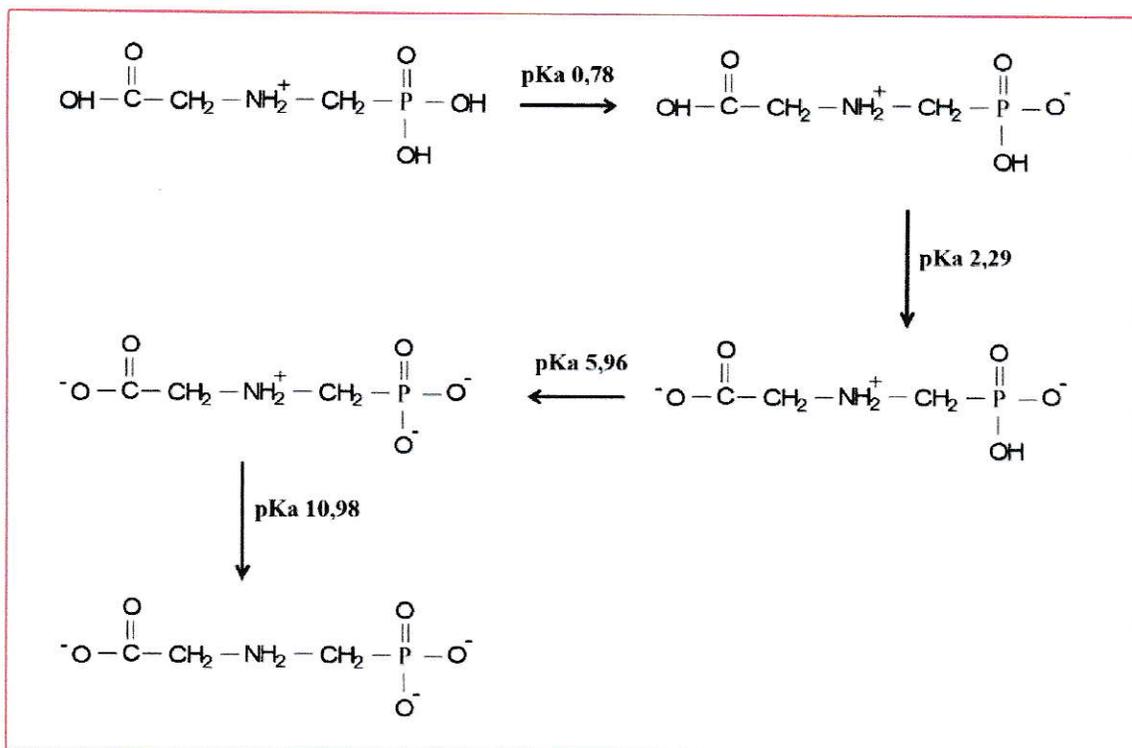


Figura 4. Disociación de la molécula de GPS

pKa AMPA

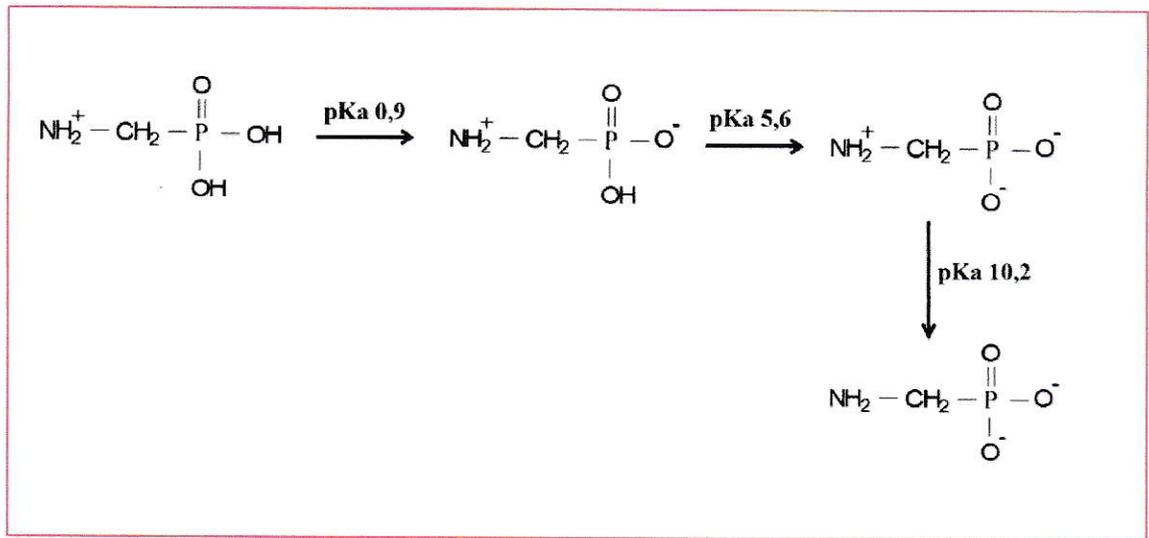


Figura 5. Disociación de la molécula de AMPA

La principal acción de este herbicida es inhibir la enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa, que cataliza el sexto paso de la ruta de un aminoácido aromático de la shiquimata, evitando así la producción de aminoácidos aromáticos esenciales para las plantas como la fenilalanina, el triptófano y la tirosina (Stalikas y col, 2001).

El movimiento de los plaguicidas en el ambiente es muy complejo e incluye transferencias que ocurren continuamente entre diferentes compartimentos medioambientales. El proceso de translocación de los herbicidas se puede lograr por varias rutas, tales como el arrastre de partículas por las corrientes de aire, evaporación y a través de corrientes de agua. Debido a la alta afinidad de GPS por los componentes del suelo, es prácticamente inmóvil y a pesar de su gran solubilidad en agua, presentaría una

menor probabilidad de transporte por lixiviación o arrastre por escorrentía. Sin embargo, existen antecedentes respecto a la presencia a niveles residuales de este herbicida tanto en aguas superficiales como subterráneas (Ibañez y col, 2006; Lee y col., 2002). Por otro parte, debido a su baja presión de vapor es un compuesto considerado como no volátil.

Glifosato tiene una persistencia moderada en el sistema edáfico. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) ha establecido que su vida media en el suelo es de alrededor de 60 días. Sin embargo, se añade que se han encontrado residuos del herbicida al año siguiente. Por otro lado, el mismo organismo lo ubica en la categoría III de toxicidad: productos que llevan la etiqueta precaución. Pese a que GPS tiene una toxicología menor que otros herbicidas, se requiere un estudio minucioso acerca de él, debido a que su aplicación es cada vez mayor. Según la OMS la tasa de aplicación no debe sobrepasar los 5,8 Kg/há (World Health Organization, 1994).

La adsorción de los contaminantes orgánicos en el suelo puede verse afectada por factores como: tipo y contenido de minerales, contenido de materia orgánica, pH y capacidad de intercambio catiónico. Glifosato posee características singulares de adsorción, debido a que su pequeña estructura con tres grupos funcionales polares facilita la interacción con sílice, alúmina y óxidos de hierro de las partículas del suelo (De miranda Colombo y col, 2011). Por otra parte, estudios muestran que el fosfato juega un papel importante en la determinación de la biodisponibilidad y lixiviación de GPS en el suelo y en algunos casos el fosfato es capaz de desorber completamente el analito. Además se ha propuesto que en suelos con mineralogía dominada por

compuestos cristalinos, GPS y fosfato, compiten por los sitios de adsorción (Gimsing y col., 2002).

En este trabajo de investigación se utilizaron tres suelos provenientes de la zona centro sur de Chile: Collipulli, Comalle y Santa Luisa.

El suelo Collipulli es un Ultisol, derivado de cenizas volcánicas. Es representativo de las áreas cultivables de la IX y X región. Se caracteriza por tener una superficie de carga variable dependiente del pH. Este suelo ha demostrado tener una alta capacidad de adsorción para GPS (Cáceres-Jensen y col, 2009). Comalle se ubica en la provincia de Curicó, región del Maule y Suelo Santa luisa pertenece a la VI región.

La extracción de GPS y AMPA desde el suelo es un gran desafío considerando la alta complejidad de la matriz y el comportamiento de ellos frente a diversos compuestos. Se han realizado estudios con distintos métodos para extraer ambos analitos desde el sistema edáfico, sin embargo las recuperaciones han sido deficientes e irreproducibles. El efecto combinado del carácter anfótero de GPS y AMPA con sus altas solubilidades en agua, hacen imposible el uso convencional de extracción por disolventes orgánicos. Un método a considerar es la extracción asistida por microondas (MAE), la cual ofrece una gran reducción en el tiempo de trabajo y consumo de disolventes, además de un alto rendimiento de extracción. No obstante es muy exhaustiva, co-extrayendo junto con los analitos una serie de compuestos interferentes que deben ser eliminados (Fuentes y col., 2007).

Debido a que el suelo es una matriz muy compleja y que GPS y AMPA se encuentran a bajos niveles de concentración se requiere de un método altamente sensible que permita determinar y cuantificar eficazmente ambos analitos a la vez.

Los principales métodos utilizados para la determinación de GPS y AMPA en agua son la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), la cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de fluorescencia (HPLC-FLD) y cromatografía de intercambio iónico con detector UV (IEC-UV). La cromatografía líquida (LC) acoplada a espectrometría de masas, es un método sensible y robusto para la cuantificación de GPS en agua natural. Estudios demuestran que los límites de cuantificación obtenidos pueden llegar a 0,7 ng/L y 0,8 ng/L para GPS y AMPA, respectivamente y los límites de detección a 0,2 ng/L para ambos analitos (Hanke y col. 2008).

La cuantificación de estos analitos, a bajos niveles de concentración, se hace compleja debido a sus características fisicoquímicas. En particular la detección por fluorescencia no puede ser aplicada debido a que los analitos no presentan grupos detectables por este método, por lo que es requerida una reacción previa de derivatización que permita generar derivados fluorescentes; además los analitos presentarán menor carácter polar lo que facilitará la retención cromatográfica. Los reactivos derivatizantes más utilizados son el 9-fluorenilcloroformiato (FMOC-CL) utilizado en modo de pre columna, el o-ftalaldehido (OPA) utilizado en modo post columna y el 1-fluoro-2,4dinitrobenceno y el p-toluensulfonilcloruro utilizados para la detección UV visible (Corbera y col., 2006).

Un desafío a considerar cuando se utiliza FMOC-Cl como reactivo derivatizante es la formación de subproductos como el FMOC-OH, obtenido por hidrólisis y descarboxilación del reactivo original. Estos compuestos, de baja solubilidad en agua, interferirían en el método cromatográfico por precipitación en el sistema, afectando a la columna cromatográfica y por consiguiente a la sensibilidad y robustez del método global. Una forma de prevenir lo anterior es elegir adecuadamente las condiciones de la reacción de derivatización y de limpieza de la solución final. Tiempos cortos y bajas temperaturas minimizan la formación de FMOC-OH (Hanke, 2008). La figura 6 muestra la reacción típica de derivatización de una molécula de GPS o AMPA con FMOC-Cl para la formación de derivados con características fluorescentes.

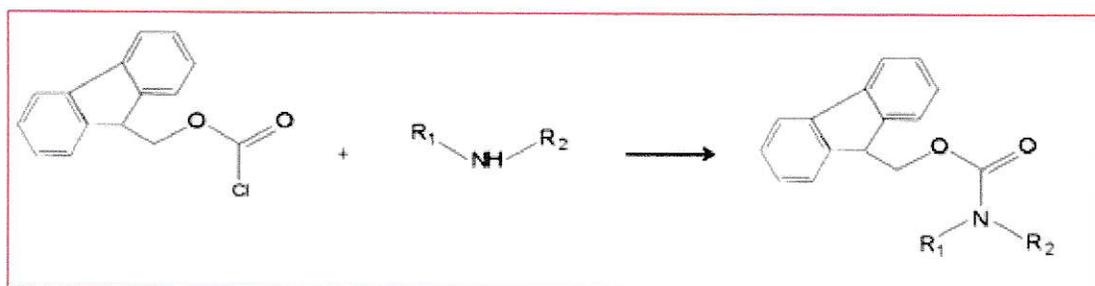


Figura 6. Reacción de derivatización

Donde:

$R_1 = H_2PO_3$

$R_2 = COOH$ (para GPS) o NH_2 (para AMPA)

En el presente seminario se aborda el estudio de la reacción de derivatización conjunta de GPS y AMPA mediante FMOC-Cl para la obtención de una metodología que permita la determinación analítica de los correspondientes derivados fluorescentes a niveles de concentración del orden de trazas. Para ello se utilizaron diseños multivariados que permiten definir la influencia de los diferentes factores que intervienen en la reacción y sus interacciones. Una vez definidas las condiciones óptimas se establecieron los parámetros de calidad analítica del método y se aplicó en un estudio de adsorción de ambos compuestos en tres suelos de uso agrícola de nuestro país. Finalmente se utilizó dicha metodología para la realización de un estudio preliminar de la extracción por solventes asistida por microondas de los dos compuestos en el suelo que presentó la menor capacidad de adsorción.

Este trabajo podría constituir un gran aporte teniendo en cuenta el uso masificado de GPS tanto a nivel mundial como en la agricultura de nuestro país y la necesidad de contar con estudios científicos que describan su comportamiento en el sistema edáfico y las posibles repercusiones que pueda ocasionar en el entorno.

1.1. Hipótesis

El carácter cuantitativo de la reacción de derivatización de GPS y AMPA mediante el uso de FMOC-Cl será influenciado por factores propios de la reacción y por las diferentes propiedades químicas de los suelos tanto en su aplicación en estudios de adsorción como en la extracción de sus residuos

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

- Validar una metodología de determinación analítica de GPS y AMPA a niveles residuales en matrices de diferente complejidad.

1.2.2. Objetivos específicos

- Optimizar y validar una metodología analítica para la determinación simultánea de GPS y AMPA por medio de la reacción de derivatización con FMOC-Cl y posterior detección mediante HPLC-fluorescencia.
- Aplicar el método propuesto en estudios de adsorción de GPS y AMPA en suelos de diferente origen.
- Realizar un estudio preliminar de los factores que afectan la extracción asistida por energía de microondas de GPS y AMPA desde suelos.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

○ *Reactivos*

- Acetonitrilo grado HPLC Merck
- Diclorometano grado HPLC Merck
- Ácido Clorhídrico 37% p/v p.a Merck
- Borato de sodio 10-Hidrato p.a Winkler
- Cloruro de Potasio p.a.
- Cloruro de Calcio p.a.
- Hidróxido de Potasio p.a
- Fosfato de potasio (hidrogeno fosfato di potasio anhidro) p.a. Merck
- Agua Nanogrado
- Fmoc-Cl, (9-fluorenilcloroformiato \geq 99% de pureza, Fluka)

○ *Materiales*

- Micropipeta 100 -1000 μ L
- Micropipeta de 20- 200 μ L
- Material de vidrio y plástico de uso general y volumétrico
- Membrana de PVDF 0,22 μ m de poro, 13 mm de diámetro 1000/cx. Miller
- Columnas de extracción en fase solida supra-clean SPE columns C-18 U-S Perkin Elmer.

o **Estándares**

- GPS, (N-(fosfonometil) glicina 96% de pureza, Aldrich)
- AMPA, (Ácido Aminometilfosfónico 99% de pureza, Aldrich)
- GPS-FMOC, (N-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy) carbonyl]-N-(phosphonomethyl) glycine 97% de pureza, Dr. Ehrenstorfer GmbH)

2.2 Suelos

Se utilizaron muestras de tres suelos de uso agrícola, Santa Luisa, Comalle y Collipulli, de la VI, VII y IX Regiones, respectivamente. Las muestras fueron secadas al aire y tamizadas a 2 mm y posteriormente, almacenadas en frascos plásticos a temperatura ambiente. Las propiedades Físicas y Químicas más relevantes se encuentran en la tabla 1.

Tabla 1. Características de los suelos

Suelo	% Carbono orgánico*	% Arcilla	% Arena	% Limo	pH* (medido en agua)
Collipulli	3,87	8,72	79,28	12	5,10
Comalle	1,40	45,44	26,56	28	6,44
Santa Luisa	1,22	21,44	54,56	24	6,81

* Determinados de acuerdo a metodología de Sadzawka y col. 2006

o ***Equipos***

- Balanza, Precisa 4000 C
- Balanza analítica, Precisa 40SM-200A
- Centrifuga, Laboguge 400, Heraeus Instrument.
- pH metro, Fisher Scientific
- Horno de microondas High Performance Microwave Digestion Unit, MLS 1200 mega, Milestone.
- Agitador, Heidolph Reax 2.
- Cromatógrafo líquido marca Waters equipado con una bomba cuaternaria Waters 600, un detector de arreglo de diodos Waters 996, un detector de fluorescencia Waters 2475 multi- λ y un muestreador automático Waters 717 Plus. Para la separación cromatográfica de los analitos se utilizó una columna YMC-Pack Pro C18, S- 5 μm de medidas 250 x 4,6 mm I.D; El control de los equipos y la adquisición y procesamiento de datos se realizó con el software Empower Pro.

2.3 Métodos

2.3.1 Método cromatográfico

La separación de los analitos y del agente derivatizante residual por medio de HPLC se realizó con una fase móvil Buffer borato pH 8:ACN, en modo gradiente (tabla 2), a una velocidad de flujo de 1,2 mL/min, y una temperatura de columna de 35°C. La longitud de onda utilizada en DAD fue un barrido entre 210 y 400 nm, y para fluorescencia las longitudes de onda de excitación y emisión se fijaron en 263 y 317 nm respectivamente.

Tabla 2. Gradiente de la fase móvil

Tiempo	Gradiente	
	% ACN	% Buffer Borato pH 8
0 – 5	5	95
5 – 8	80	20
8 – 14	5	95

2.3.2 Diseño exploratorio

Se planteó un diseño factorial de tipo exploratorio (“Screening”) para cinco condiciones experimentales y dos niveles (2^5) dando lugar a 32 experimentos (tabla 4), y se repitieron 4 de ellos para la estimación del error experimental. Los factores estudiados fueron la concentración de derivatizante, concentración de analitos, tiempo de reacción, cantidad de ACN presente en la reacción y tiempo que transcurre para la lectura; estos se muestran en la tabla 3.

La reacción de derivatización se realizó agregando 1 mL de buffer borato 40 mM a 8 mL de una solución GPS-AMPA, de concentración conocida. Luego se adicionó, ACN y por último el reactivo derivatizante (las cantidades agregadas están dadas por el diseño). Finalmente se eliminó el exceso del reactivo derivatizante mediante reparto con 2 porciones de 2 mL de diclorometano. El diseño experimental se obtuvo a partir del programa computacional Statgraphics Centurion XV.

Tabla 3. Factores y niveles del diseño experimental

Factor	Niveles	
	-1	+1
A: Concentración de derivatizante ($\mu\text{g/mL}$)	40	200
B: Concentración de analitos ($\mu\text{g/mL}$)	0,1	1,0
C: Tiempo de reacción (h)	1	17
D: Cantidad de ACN presente en la reacción (%)	5	10
E: Tiempo que transcurre para la lectura (h)	1	24

Tabla 4. Matriz codificada del diseño experimental

Nº Experimento	Matriz Codificada				
	A	B	C	D	E
1	1	-1	1	1	1
2	1	-1	-1	-1	-1
3	1	1	1	-1	-1
4	-1	1	-1	-1	1
5	-1	-1	1	-1	1
6	-1	1	1	-1	-1
7	1	1	1	-1	1
8	-1	1	1	1	1

9	-1	1	-1	-1	-1
10	-1	-1	1	-1	-1
11	1	-1	1	-1	1
12	-1	-1	1	1	1
13	-1	-1	-1	-1	1
14	1	1	-1	1	-1
15	-1	1	1	-1	1
16	-1	-1	-1	-1	-1
17	-1	1	-1	1	1
18	1	-1	1	-1	-1
19	1	1	-1	-1	1
20	-1	-1	1	1	-1
21	-1	-1	-1	1	-1
22	1	-1	1	1	-1
23	1	-1	-1	1	1
24	1	1	-1	1	1
25	1	1	1	1	-1
26	1	-1	-1	1	-1
27	-1	-1	-1	1	1
28	-1	1	1	1	-1
29	-1	1	-1	1	-1
30	1	-1	-1	-1	1
31	1	1	1	1	1
32	1	1	-1	-1	-1

2.3.2.1 Estudios complementarios previos a la optimización

- Cinética de la reacción

Se preparó una solución de GPS y AMPA de concentración 1,0 µg/mL, por separado. A 5 mL de la solución que contiene el analito se agregó 310 µL de agua, luego 620 µL de Buffer borato (40 mM) y por último 310 µL de FMOC-Cl (170 µg/mL). La reacción se realizó a 30°C. Los tiempos estudiados fueron 20 – 40 – 60 – 90 – 120 – 180 – 240 min. respectivamente. Cada punto del estudio cinético se realizó en duplicado.

- Limpieza de la solución para la eliminación del exceso de FMOC-Cl

Se compararon los siguientes tres procedimientos:

- Limpieza con Diclorometano: A la solución derivatizada se le agregó 2 mL de CH₂Cl₂, se agitó manualmente, se separó el solvente por sedimentación y se extrajo mediante una pipeta Pasteur. Este procedimiento se repitió una vez para posteriormente medir los analitos y el reactivo derivatizante para comprobar la eficiencia del lavado.
- Cambio de solvente: Se extrajo una alícuota de 1 mL de la solución derivatizada y se agregaron 5 mL de agua nanogrado, terminando con una filtración por membrana.
- Extracción en fase sólida: De la solución derivatizada se extrajo una alícuota de 5 mL y se agregaron 10 mL de agua nanogrado. A continuación se pasaron los 15 mL a través de una columna de extracción en fase sólida supra-clean SPE

columns C-18. El eluato fue recibido en un matraz de aforo de 25 mL que contenía 2 mL del buffer borato para mantener el pH de la solución.

2.3.3 Optimización

A partir de los resultados obtenidos por el diseño exploratorio y de los estudios complementarios, se estableció un estudio final de optimización del método mediante un diseño factorial multinivel ($4^2 \cdot 2^1$), dando lugar a 32 experimentos (tabla 6) repitiéndose 4 de ellos para la estimación del error experimental. Los factores estudiados y sus niveles se encuentran en la tabla 5.

Para la reacción de derivatización se agregó 600 μ L de buffer borato 40 mM a 5 mL de una solución de GPS – AMPA, de concentración conocida. Luego se adicionó 2 mL de ACN y por último 300 μ L de FMOC-Cl. Transcurrido el tiempo, se tomó una alícuota de 5 mL y se diluyó con 10 mL de agua nanogrado. A continuación se realizó una extracción en fase sólida recibiendo el eluato en un matraz de 25 ml que contenía 2 mL de buffer borato. El diseño de optimización se obtuvo a partir del programa computacional Statgraphics Centurion XV.

Tabla 5. Factores y niveles del diseño experimental factorial multivariado

Factor	Niveles			
	-1	-0,33	+0,33	+1
A: Interferencia entre los analitos	0,2 µg/mL GPS - 0,2 µg/mL AMPA	-	-	0,2 µg/mL GPS - 2,0 µg/mL AMPA
B: Concentración reactivo derivatizante (µg/mL)	40	80	120	160
C: Tiempo de reacción (min.)	20	40	60	120

Tabla 6. Matriz codificada del diseño experimental factorial multivariado

Nº experimento	Matriz Codificada		
	A	B	C
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	-0,3333	-1
4	1	-0,3333	-1
5	-1	0,3333	-1
6	1	0,3333	-1
7	-1	1	-1
8	1	1	-1
9	-1	-1	-0,333
10	1	-1	-0,333
11	-1	-0,3333	-0,333
12	1	-0,3333	-0,333
13	-1	0,3333	-0,333
14	1	0,3333	-0,333
15	-1	1	-0,333
16	1	1	-0,333
17	-1	-1	0,3333
18	1	-1	0,3333
19	-1	-0,3333	0,3333
20	1	-0,3333	0,3333
21	-1	0,3333	0,3333

22	1	0,3333	0,3333
23	-1	1	0,3333
24	1	1	0,3333
25	-1	-1	1
26	1	-1	1
27	-1	-0,3333	1
28	1	-0,3333	1
29	-1	0,3333	1
30	1	0,3333	1
31	-1	1	1
32	1	1	1

2.3.4 Parámetros analíticos instrumentales

Los límites de detección y cuantificación es posible calcularlos mediante curvas de calibración. Para ello se realizó una curva para la determinación simultánea de GPS–AMPA de concentraciones: 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80; 1,0 µg/mL. Cada punto se preparó en duplicado. A partir de los datos se determinaron los siguientes parámetros: linealidad, sensibilidad, límite de detección y límite de cuantificación. A continuación se describen las ecuaciones utilizadas para el cálculo de cada parámetro a partir de las constantes de la ecuación de regresión lineal para la relación entre concentración de cada analito y la respuesta expresada en áreas.

» Sensibilidad

$$S = \frac{s_y}{b} \quad //$$

» Linealidad:

$$L = 1 - \frac{S_b}{b} \quad /2/$$

» Límite de detección

$$LDD = \frac{3 S_x^y}{b} \sqrt{\frac{N-2}{N-1}} \quad /3/$$

» Límite de cuantificación

$$LDC = \frac{10 S_x^y}{b} \sqrt{\frac{N-2}{N-1}} \quad /4/$$

En donde:

S_x^y = desviación estándar de la regresión

b = pendiente

S_b = desviación estándar de la pendiente

N = numero de pares de datos

2.3.5 Aplicación del método de derivatización

2.3.5.1 Estudio de interferencia de matriz con electrolito soporte

Para realizar estudios posteriores se requiere conocer el comportamiento de los analitos frente a ciertos electrolitos soportes como son calcio y potasio.

Para el trabajo de investigación se utilizaron soluciones de CaCl_2 0,01 M, KCl 0,01 M y H_2O en los suelos Collipulli, Comalle y Santa Luisa. Además se preparó una solución patrón de GPS-AMPA de concentración 1,0 $\mu\text{g/mL}$.

Se agregó 20 mL de solución a 4 gramos de suelo y se agitó por 2 horas a 30°C. Luego la muestra se somete a centrifugación a 3500 RPM por 20 minutos. Con el extracto obtenido se preparó una solución de GPS-AMPA de concentración 1,0 $\mu\text{g/mL}$. Por último se tomó una alícuota de 5 mL de la muestra para su posterior derivatización.

2.3.5.2 Estudio preliminar de adsorción

Este trabajo de investigación se realizó con una solución de KCl 0,01 M, como extracto, y con tres suelos: Collipulli, Comalle y Santa Luisa, con el objetivo de conocer la cantidad de analito que puede ser adsorbido por los suelos.

A 2 gramos de suelo se agregó una alícuota de 10 mL de solución GPS-AMPA de concentración 50,0 $\mu\text{g/mL}$ en KCl 0,01 M y se agitó por 2 horas a 30°C. Luego la muestra fue sometida a centrifugación a 3500 RPM por 20 minutos. Finalmente se extrajo una alícuota de 5 mL del sobrenadante para ser derivatizada.

2.3.5.3 Isotermas de adsorción

Se realizó un estudio de isotermas, como una aplicación del método propuesto, en donde los suelos utilizados fueron Collipulli, Comalle y Santa Luisa.

Para la obtención de las isotermas se pusieron en contacto 2 g de suelo con 10 mL de soluciones de 10; 20; 30; 40 y 50 µg/mL de GPS-AMPA en KCl 0,01 M; derivatizando una alícuota de 5 mL.

La cantidad de herbicida adsorbido fue calculado por la diferencia entre la concentración inicial y la concentración final del herbicida en solución.

La adsorción fue descrita por la ecuación de Freundlich

$$C_s = K_f * C_e^{1/n} \quad /5/$$

Donde:

C_s = Cantidad de herbicida adsorbido

C_e = Concentración de equilibrio en solución

K_f y $1/n$ = constantes empíricas

El coeficiente de carbono orgánico (K_{oc}), fue calculado a partir de la siguiente expresión

$$K_{oc} = (K_f / \%CO) * 100 \quad /6/$$

2.3.6 Estudio preliminar de Extracción

Se realizaron estudios preliminares de extracción de GPS y AMPA desde el suelo, con la finalidad de conocer su comportamiento para estudios posteriores. La matriz utilizada en estos estudios fue el suelo Santa Luisa.

2.3.6.1 Diseño exploratorio

Se planteó un diseño factorial de tipo exploratorio para cinco condiciones experimentales y dos niveles (2^5) dando lugar a 32 experimentos (tabla 8), repitiéndose 4 de ellos para la estimación del error experimental. Los factores estudiados fueron potencia, tiempo, extractante, pH, peso muestra; estos se muestran en la tabla 7.

El diseño experimental se obtuvo a partir del programa computacional Statgraphics Centurion XV.

Fortificación del suelo: A los gramos de suelo utilizados contenidos en un vaso de microondas, se agregó 1 mL de una solución acuosa GPS-AMPA de concentración 10 $\mu\text{g/mL}$. Se agitó por dos horas y se dejó a 4°C por 16 horas.

Extracción: Transcurrido el tiempo, se realizó la extracción agregando 10 mL de extractante a la muestra para ser sometidas a microondas con la potencia y tiempo correspondiente. Luego las muestras fueron centrifugadas a 3500 RPM por 20 minutos. Finalmente, se tomó una alícuota de 5 mL para su posterior derivatización.

Tabla 7. Factores y niveles del diseño experimental factorial

Factor	Niveles	
	-1	+1
A: Potencia (W)	400	650
B: Tiempo (min)	5	10
C: Extractante	K ₂ HPO ₄	KOH
D: pH	9	11
E: Peso muestra (g)	1	2

Tabla 8. Matriz codificada en el diseño experimental factorial de la extracción de los analitos desde el suelo

N° Experimento	Matriz Codificada				
	A	B	C	D	E
1	-1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1	-1
4	1	1	-1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1	-1
6	1	-1	1	-1	-1
7	-1	1	1	-1	-1
8	1	1	1	-1	-1
9	-1	-1	-1	1	-1
10	1	-1	-1	1	-1
11	-1	1	-1	1	-1
12	1	1	-1	1	-1
13	-1	-1	1	1	-1
14	1	-1	1	1	-1
15	-1	1	1	1	-1
16	1	1	1	1	-1
17	-1	-1	-1	-1	1
18	1	-1	-1	-1	1
19	-1	1	-1	-1	1
20	1	1	-1	-1	1
21	-1	-1	1	-1	1
22	1	-1	1	-1	1
23	-1	1	1	-1	1
24	1	1	1	-1	1

25	-1	-1	-1	1	1
26	1	-1	-1	1	1
27	-1	1	-1	1	1
28	1	1	-1	1	1
29	-1	-1	1	1	1
30	1	-1	1	1	1
31	-1	1	1	1	1
32	1	1	1	1	1

A partir de los resultados obtenidos del diseño exploratorio se realizaron estudios complementarios para dilucidar el origen de las bajas recuperaciones; además de probar una técnica descrita en la literatura para eliminar los posibles complejos formados.

Para conocer el origen de las bajas recuperaciones, se realizó un estudio derivatizando un extracto de suelo Santa Luisa (obtenido bajo las condiciones descritas a continuación) fortificado con una solución de GPS y AMPA de 1,0 µg/mL. La respuesta obtenida se comparó con un estándar acuoso de los analitos de 1,0 µg/mL. A modo de comparación se realizó una extracción de un suelo fortificado de igual forma a lo ya descrito en el punto 2.3.6.1 utilizando como extractante K₂HPO₄ a pH 9 y 500 Watts de potencia por 5 minutos para las microondas.

Por otro lado, se comprobó una técnica para romper los complejos formados. Para ello los extractos de suelo Santa Luisa (obtenidos bajo las condiciones descritas) fueron acidificadas previo a la derivatización con HCl 12 M hasta pH1 generando un precipitado el que se trató de la siguiente manera:

- i) Se adicionó KOH de concentración 12 M para restaurar el pH inicial (pH 9) disolviendo, de esta manera el precipitado.
- ii) El precipitado fue separado por centrifugación a 3500 RPM por 10 minutos. Luego se adicionó KOH de concentración 12 M para restaurar el pH inicial.

Paralelamente se realizó una extracción sin incluir la adición de estos reactivos para la comparación de los resultados. Todas las fortificaciones fueron de 10 µg/mL de GPS y AMPA.

La figura 7 muestra la metodología utilizada para la extracción de los analitos.



Figura 7. Metodología de extracción de GPS y AMPA asistida por microondas

III. RESULTADOS

3.1 Método cromatográfico

La identificación de los analitos derivatizados se realizó con un detector de arreglo de diodos, a través del estudio de sus espectros que deben ser similares al espectro de FMOC-Cl. La similitud de los espectros radica en la estructura de la molécula de FMOC-Cl, la cual es predominante frente a las pequeñas moléculas de ambos analitos. Los tiempos de retención para GPS y AMPA son de 7,003 y 7,387 minutos respectivamente. El cromatograma fue extraído a 265,1 nm ya que el analito registra un máximo de absorción a esa longitud de onda y no se observa co-elución de otros compuestos. En la figura 8 se muestra el cromatograma obtenido a partir de una solución de GPS-AMPA de 1,0 $\mu\text{g/mL}$, diluida 10 veces, utilizando detector DAD; por otro lado la figura 9 muestra los espectros correspondientes a cada uno de los analitos y del reactivo derivatizante.

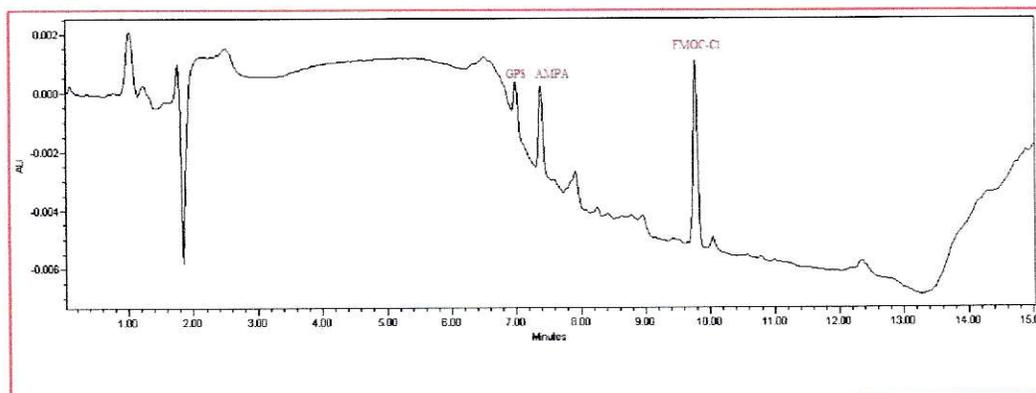


Figura 8. Cromatograma tipo con detector DAD

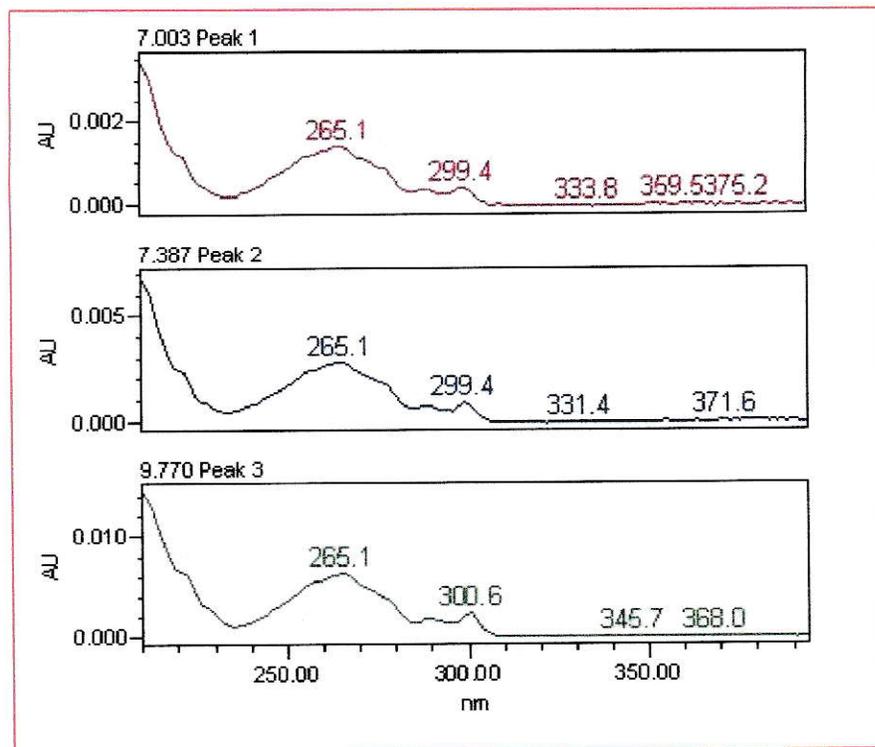


Figura 9. Espectros UV de los compuestos: peak 7,003 corresponde a GPS, peak 7,387 corresponde a AMPA y peak 9,770 corresponde a FMOC-Cl.

La literatura es muy variada con respecto a las condiciones analíticas que se deben utilizar en HPLC-FLD para la determinación de GPS y AMPA derivatizados con FMOC-Cl. Por ejemplo Corbera (2006), propuso una fase móvil consistente en ACN:Buffer fosfato a pH 5,5 (ácida), al contrario de lo propuesto por Hanke (2008), en que la fase móvil consistió en una solución de acetato de amonio 0,5 mM ajustada a pH 9 (básica). Ante la disparidad de la metodología reportada, se procedió a determinar el gradiente y fase móvil óptimos para la separación de los analitos, para ello se utilizaron cuatro condiciones distintas, que se resumen en las tablas 9, 10, 11 y 12.

**Tabla 9. Gradiente de la fase móvil ACN:acetato de sodio con ácido acético
(pH 2,53)**

Tiempo (min)	% ACN	% Acetato de sodio con ácido acético (pH 2,53)
0-5	5	95
5-10	80	20
10-17	80	20
17-19	5	95

Tabla 10. Gradiente de la fase móvil ACN:agua ajustada a pH 2,53 con H₃PO₄

Tiempo (min)	% ACN	% Agua pH 2,53
0-5	5	95
5-10	80	20
10-17	80	20
17-19	5	95

Tabla 11. Gradiente de la fase móvil ACN:Buffer borato pH 8

Tiempo (min)	% ACN	% Buffer borato pH 8
0-5	5	95
5-10	80	20
10-15	5	95

Tabla 12. Gradiente de la fase móvil ACN:Buffer borato pH8

Tiempo (min)	% ACN	% Buffer borato pH 8
0-5	5	95
5-8	80	20
8-14	5	95

Teniendo en cuenta los antecedentes antes expuestos y los valores de pKa de ambos analitos, se optó por utilizar como fase móvil una solución de ACN:Buffer borato pH 8. La permanencia de las especies ionizadas provenientes de la etapa de derivatización permitió lograr menores tiempos de retención debido a su menor afinidad por la fase estacionaria y una mayor eficiencia. Con esta misma base se consideró de importancia la mantención del pH básico resultante de la reacción de derivatización, en donde solo predomina una especie química lo que se traduce en una adecuada simetría de los correspondientes picos. En cambio a pH ácido (pH 2,53) podría existir más de una especie presente en la solución, en donde ambas generarían una señal cromatográfica acoplada.

En las condiciones cromatográficas propuestas se logró la separación de los analitos con una alta eficiencia y adecuada resolución. En la tabla 13 se encuentran los tiempos de retención, ancho de pico en la base, resolución y número de platos teóricos calculados usando una solución de 1,0 µg/mL de GPS-AMPA. En la figura 10 se observa el cromatograma obtenido para dicha solución con detector de fluorescencia. El tiempo total de análisis es de 14 minutos, incluida la etapa de re-equilibrio de la columna. El pico correspondiente al reactivo derivatizante, que de acuerdo a la reacción puede encontrarse en una cantidad apreciable y con la posibilidad de interferir o co-eluir con los analitos de interés, en estas condiciones eluye a un tiempo de retención de 12,250 min.

Tabla 13. Parámetros cromatográficos

	GPS	AMPA
Tiempo de retención (min)	9,037	9,330
Ancho pick (s)	15	16
Número de platos teóricos	20906,84	19586,00
Resolución	1,13	

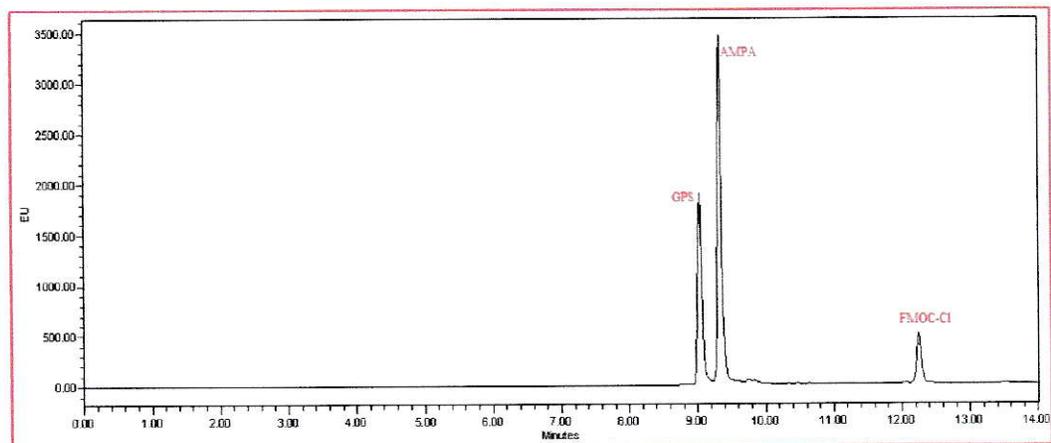


Figura 10. Cromatograma tipo con detector de fluorescencia

En la figura 11 se muestra el cromatograma obtenido para las concentraciones correspondientes al límite de detección: 0,02 $\mu\text{g/mL}$ para GPS y 0,01 $\mu\text{g/mL}$ para AMPA.

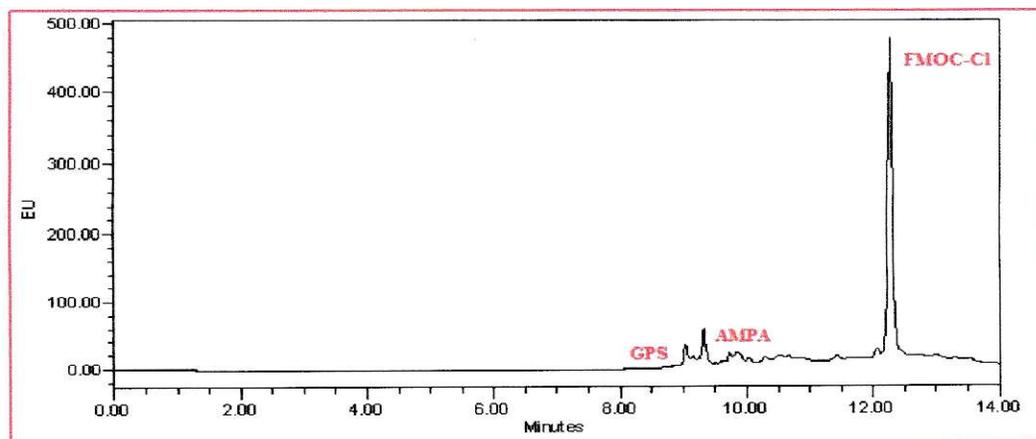


Figura 11. Cromatograma obtenido para las concentraciones correspondientes al límite de detección: 0,02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para GPS y AMPA respectivamente.

3.2 Diseño Exploratorio

Para obtener un óptimo método de derivatización sería apropiado incluir, en un estudio, todas las variables que interfieren en su desarrollo. Sin embargo, no existe información referente a un estudio integrado. Por otro lado la información encontrada acerca de la reacción de derivatización de GPS y AMPA con FMOC-Cl no es concordante, por lo que no están plenamente definidas las directrices a seguir para este tipo de estudio

Sin embargo, a partir de la literatura se han establecido parámetros que podrían influir en el rendimiento de la reacción, que son los siguientes: concentración de los analitos y del reactivo derivatizante, tiempo de reacción, cantidad de ACN presente en la reacción, y tiempo que transcurre para la lectura.

Para procesar las respuestas cromatográficas obtenidas, se utiliza el programa computacional Statgraphics Centurion XV mediante ANOVA. Al trabajar con dos concentraciones de analitos se requiere que sean normalizadas para tener un parámetro de comparación. Los factores experimentales estudiados fueron:

A: concentración de derivatizante

B: concentración de analitos

C: tiempo de reacción

D: cantidad de ACN presente en la reacción

E: tiempo que transcurre para la lectura

La matriz decodificada del diseño y los resultados obtenidos para cada experimento se muestra en la tabla 14.

Tabla 14. Matriz decodificada y respuestas cromatográficas del estudio exploratorio

N° Experimento	Matriz Decodificada					Área	
	A	B	C	D	E	GPS (x10 ⁷)	AMPA (x10 ⁷)
1	40	1,0	17	10	24	3,3814	7,2775
2	40	1,0	1	5	1	2,7907	6,873
3	200	1,0	17	5	1	4,5943	7,485
4	200	0,1	1	5	24	5,4514	16,322
5	40	0,1	17	5	24	3,6725	16,682
6	200	0,1	17	5	1	8,5205	16,476
7	200	1,0	17	5	24	4,5538	7,0465
8	200	0,1	17	10	24	7,8943	16,521
9	200	0,1	1	5	1	4,563	15,949
10	40	0,1	17	5	1	4,2393	16,478
11	40	1,0	17	5	24	2,6866	6,736
12	40	0,1	17	10	24	4,5417	16,34

13	40	0,1	1	5	24	2,8674	15,077
14	200	1,0	1	10	1	4,0158	7,253
15	200	0,1	17	5	24	7,876	16,34
16	40	0,1	1	5	1	4,9651	16,695
17	200	0,1	1	10	24	5,885	16,058
18	40	1,0	17	5	1	3,4064	7,612
19	200	1,0	1	5	24	4,0287	7,025
20	40	0,1	17	10	1	3,3112	16,606
21	40	0,1	1	10	1	4,5254	17,772
22	40	1,0	17	10	1	3,1876	6,629
23	40	1,0	1	10	24	1,8013	11,961
24	200	1,0	1	10	24	4,4423	7,5983
25	200	1,0	17	10	1	4,7342	7,5385
26	40	1,0	1	10	1	2,6721	6,911
27	40	0,1	1	10	24	3,4145	16,188
28	200	0,1	17	10	1	7,0601	16,348
29	200	0,1	1	10	1	6,8663	16,921
30	40	1,0	1	5	24	2,0647	6,65
31	200	1,0	17	10	24	4,875	7,682
32	200	1,0	1	5	1	2,8969	6,356

Las respuestas cromatográficas obtenidas se analizaron a partir del diseño experimental mediante un análisis de varianza, estableciéndose que los efectos estadísticamente significativo ($P < 0,05$) positivo en la respuesta de las áreas para GPS son la concentración de derivatizante, de los analitos y el tiempo de reacción. Para AMPA solo es significativo, negativamente, la concentración de los analitos. A continuación las figuras 12 y 13 muestran las cartas de Pareto obtenidas para GPS y AMPA respectivamente.

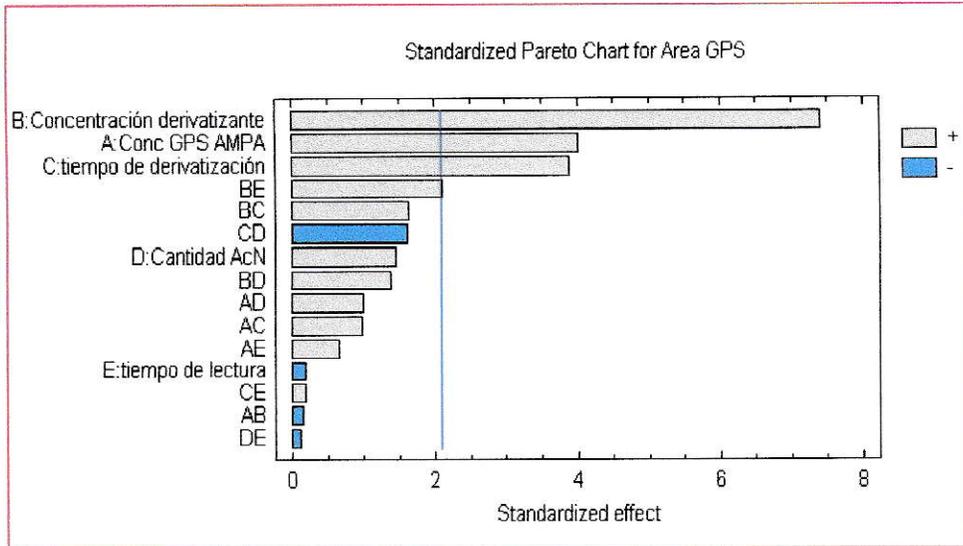


Figura 12. Carta de Pareto estandarizada para GPS

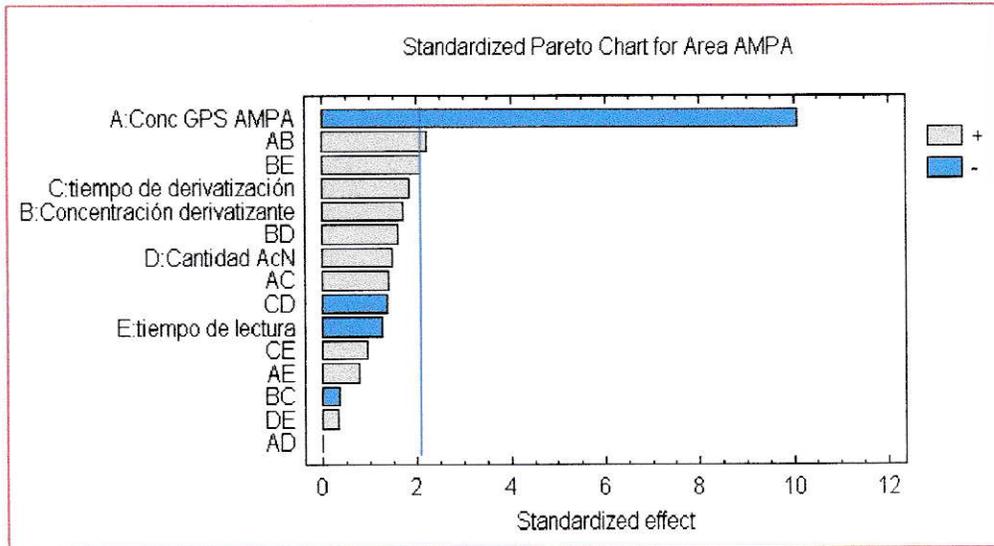


Figura 13. Carta de Pareto estandarizada para AMPA

3.2.1 Estudios complementarios previos a la optimización

Para continuar con el estudio de la reacción de derivatización se ve la necesidad de realizar algunos experimentos aclaratorios que son los siguientes.

- Estudio Cinético

El estudio cinético realizado indica que la reacción de derivatización para ambos analitos encuentra su máximo cerca de los 120 minutos (figura 14 y 15).

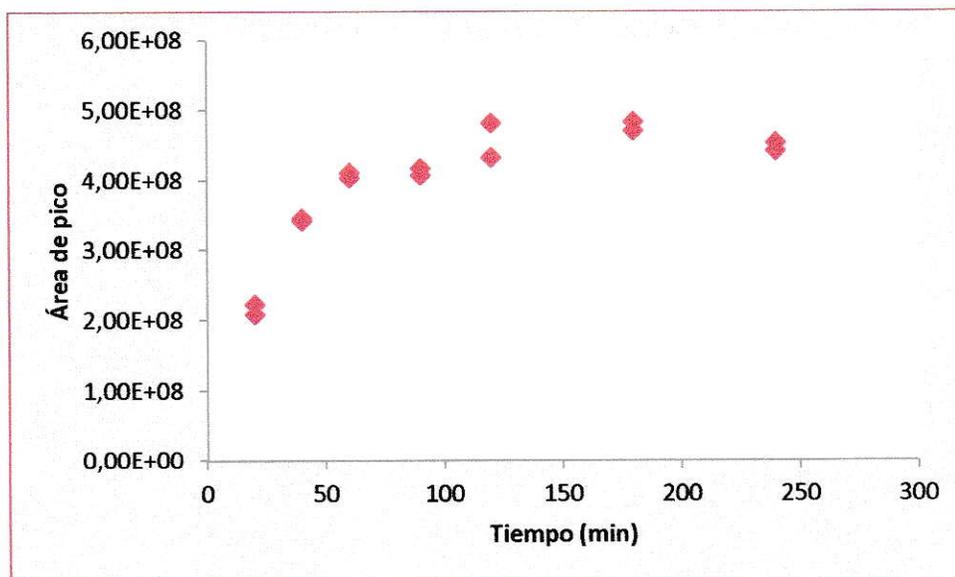


Figura 14. Estudio Cinético para GPS

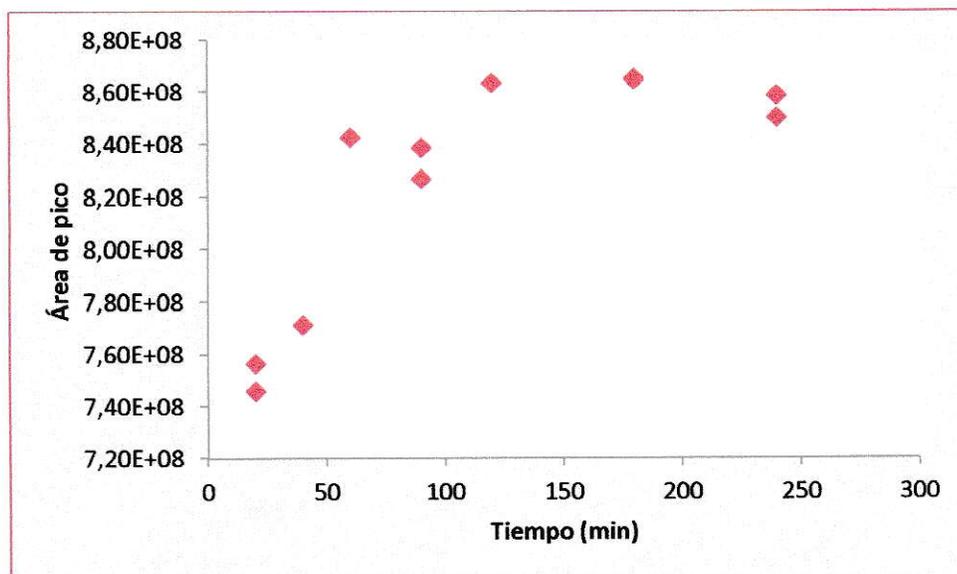


Figura 15. Estudio Cinético para AMPA

- Limpieza de la solución para la eliminación del exceso de FMOC-Cl

En la reacción de derivatización no solo GPS y AMPA reaccionan con FMOC-Cl, si no que también lo hace el agua, formando un reactivo hidrolizado (FMOC-OH), por lo que un exceso de FMOC-Cl debe ser añadido a la solución para que esta se lleve a cabo (Hanke y col, 2008); además se debe considerar que la reacción no es favorable termodinámicamente.

Debido a la irreproducibilidad en los datos obtenidos se realizó un estudio del método de limpieza de la solución derivatizada, en donde se utilizó diclorometano para eliminar el reactivo excedente. Este solvente es soluble con ACN, el cual es parte del medio de reacción. Los resultados obtenidos con esta técnica no son reproducibles por lo tanto se cree que al eliminar el CH_2Cl_2 también se elimina parte de los analitos solubilizados. Otra técnica utilizada fue el cambio de solvente en donde la solución fue diluida en agua con el objetivo de disminuir el porcentaje de ACN contenido en el medio. De esta manera por medio del filtrado se eliminaría el reactivo en exceso. Los resultados obtenidos con esta técnica no son reproducibles debido a que, al parecer, los analitos quedan retenidos en el filtro. Finalmente se utilizó una columna de extracción en fase sólida, con este método de limpieza el FMOC-Cl es eliminado en gran cantidad del medio; además se comprobó que esta técnica no afecta a los analitos, siendo la recuperación de ellos un 100%.

Hanke y col. (2008), indica que FMOC-Cl es casi insoluble en agua, por lo que la reacción debe contener una cierta cantidad de disolvente orgánico para que ocurra. Por lo tanto, el porcentaje de ACN presente en el medio de reacción es fundamental para que el reactivo derivatizante esté completamente disuelto, y de esta manera disponible. Nedelkoska y Low (2004) proponen que la relación óptima de agua:ACN que se necesita para que el FMOC-Cl este completamente disuelto es de un 50:50. Se realizaron pruebas para confirmar lo anterior dando como resultado que la reacción se debe realizar en presencia de un 25% del solvente como mínimo.

3.3 Optimización

A partir de los resultados entregados por el diseño exploratorio y de una serie de experimentos de comprobación, el estudio final de optimización se llevo a cabo acotando el intervalo del tiempo de la reacción y la cantidad de reactivo derivatizante; además se agregó el estudio acerca de la influencia que tiene AMPA sobre GPS.

Para procesar las respuestas cromatográficas obtenidas, se utiliza el programa computacional Statgraphics Centurion XV mediante ANOVA. Se requiere que las concentraciones sean normalizadas para establecer un parámetro de comparación. Los factores experimentales estudiados fueron:

A: Interacción entre los analitos

B: Concentración reactivo derivatizante

C: Tiempo de reacción

La matriz decodificada del diseño y los resultados obtenidos para cada experimento se muestra en la tabla 15.

Tabla 15. Matriz decodificada y respuestas cromatograficas en el estudio exploratorio multivariado

N° experimento	Matriz Decodificada			Área	
	A	B	C	GPS (x10 ⁷)	AMPA (x10 ⁷)
1	0,2 µg/mL GPS- 0,2 µg/mL AMPA	40	20	9,2104	2,9774
2	0,2 µg/mL GPS- 2,0 µg/mL AMPA	40	20	0,615	3,0369
3	0,2 µg/mL GPS- 0,2 µg/mL AMPA	80	20	1,267	2,8586
4	0,2 µg/mL GPS- 2,0 µg/mL AMPA	80	20	1,2205	2,9664

5	0,2 µg/mL GPS -0,2 µg/mL AMPA	120	20	1,3854	2,9298
6	0,2 µg/mL GPS- 2,0 µg/mL AMPA	120	20	1,4401	3,0341
7	0,2 µg/mL GPS- 0,2 µg/mL AMPA	160	20	1,585	2,9316
8	0,2 µg/mL GPS- 2,0 µg/mL AMPA	160	20	1,5427	2,9831
9	0,2 µg/mL GPS- 0,2 µg/mL AMPA	40	40	0,8767	2,8633
10	0,2 µg/mL GPS- 2,0 µg/mL AMPA	40	40	0,8615	2,889
11	0,2 µg/mL GPS- 0,2 µg/mL AMPA	80	40	1,4479	2,7843
12	0,2 µg/mL GPS- 2,0 µg/mL AMPA	80	40	1,2294	2,8324
13	0,2 µg/mL GPS- 0,2 µg/mL AMPA	120	40	1,399	2,7255
14	0,2 µg/mL GPS- 2,0 µg/mL AMPA	120	40	1,3987	2,8758
15	0,2 µg/mL GPS- 0,2 µg/mL AMPA	160	40	1,5192	2,7238
16	0,2 µg/mL GPS- 2,0 µg/mL AMPA	160	40	1,532	2,9046
17	0,2 µg/mL GPS- 0,2 µg/mL AMPA	40	60	0,8215	2,8478
18	0,2 µg/mL GPS- 2,0 µg/mL AMPA	40	60	0,6478	2,9118
19	0,2 µg/mL GPS- 0,2 µg/mL AMPA	80	60	1,2723	2,8123
20	0,2 µg/mL GPS- 2,0 µg/mL AMPA	80	60	1,3345	2,9294
21	0,2 µg/mL GPS- 0,2 µg/mL AMPA	120	60	1,4402	2,8597
22	0,2 µg/mL GPS- 2,0 µg/mL AMPA	120	60	1,2651	2,9461
23	0,2 µg/mL GPS- 0,2 µg/mL AMPA	160	60	1,6924	2,8776
24	0,2 µg/mL GPS- 2,0 µg/mL AMPA	160	60	1,6594	2,9498
25	0,2 µg/mL GPS- 0,2 µg/mL AMPA	40	120	0,8352	2,851

26	0,2 µg/mL GPS- 2,0 µg/mL AMPA	40	120	0,7873	3,0124
27	0,2 µg/mL GPS- 0,2 µg/mL AMPA	80	120	1,2783	2,8417
28	0,2 µg/mL GPS- 2,0 µg/mL AMPA	80	120	1,287	2,9794
29	0,2 µg/mL GPS- 0,2 µg/mL AMPA	120	120	1,4594	2,917
30	0,2 µg/mL GPS- 2,0 µg/mL AMPA	120	120	1,3059	2,9073
31	0,2 µg/mL GPS- 0,2 µg/mL AMPA	160	120	1,5641	2,7886
32	0,2 µg/mL GPS- 2,0 µg/mL AMPA	160	120	1,5501	2,9258

Se realizó el correspondiente análisis de varianza para la estimación de los efectos e interacciones entre los mismos, dando como resultados las correspondientes superficies de respuesta para cada analito.

La superficie de respuesta generada para GPS indica que a medida que aumenta la concentración del reactivo derivatizante existe un aumento en la respuesta del analito, hasta alcanzar un máximo; por otro lado no se observa interferencia de AMPA sobre GPS a altas concentraciones de FMOC-Cl; sin embargo a bajas concentraciones se observó una interferencia de AMPA sobre GPS, aunque no fue estadísticamente significativa. La superficie de respuesta de AMPA indica que existe una interacción con GPS que favorece la respuesta del metabolito. Sin embargo, debido al bajo error experimental, se consideró como una sobreestimación del efecto. A continuación las figuras 16 y 17 muestran las correspondientes superficies de respuesta para GPS y AMPA respectivamente. La figura 18 muestra un diagrama del procedimiento de derivatización.

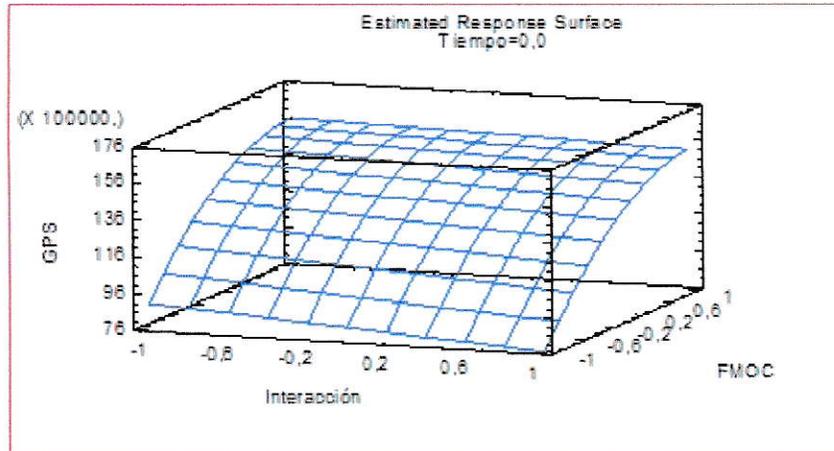


Figura 16. Superficie de respuesta optimización GPS

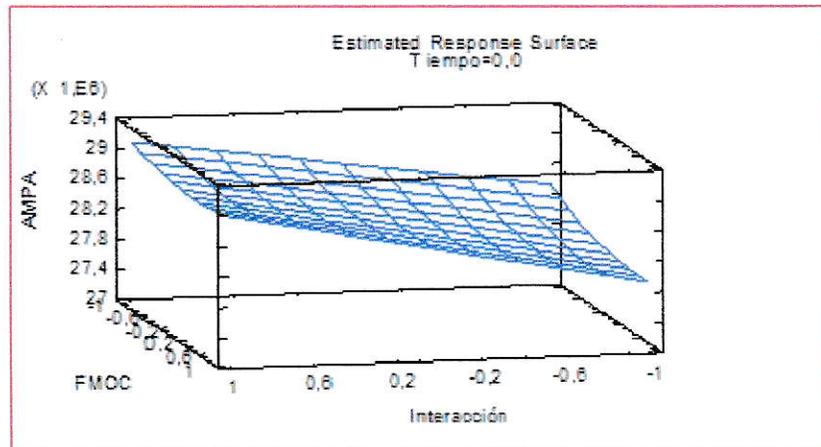


Figura 17. Superficie de respuesta optimización para AMPA

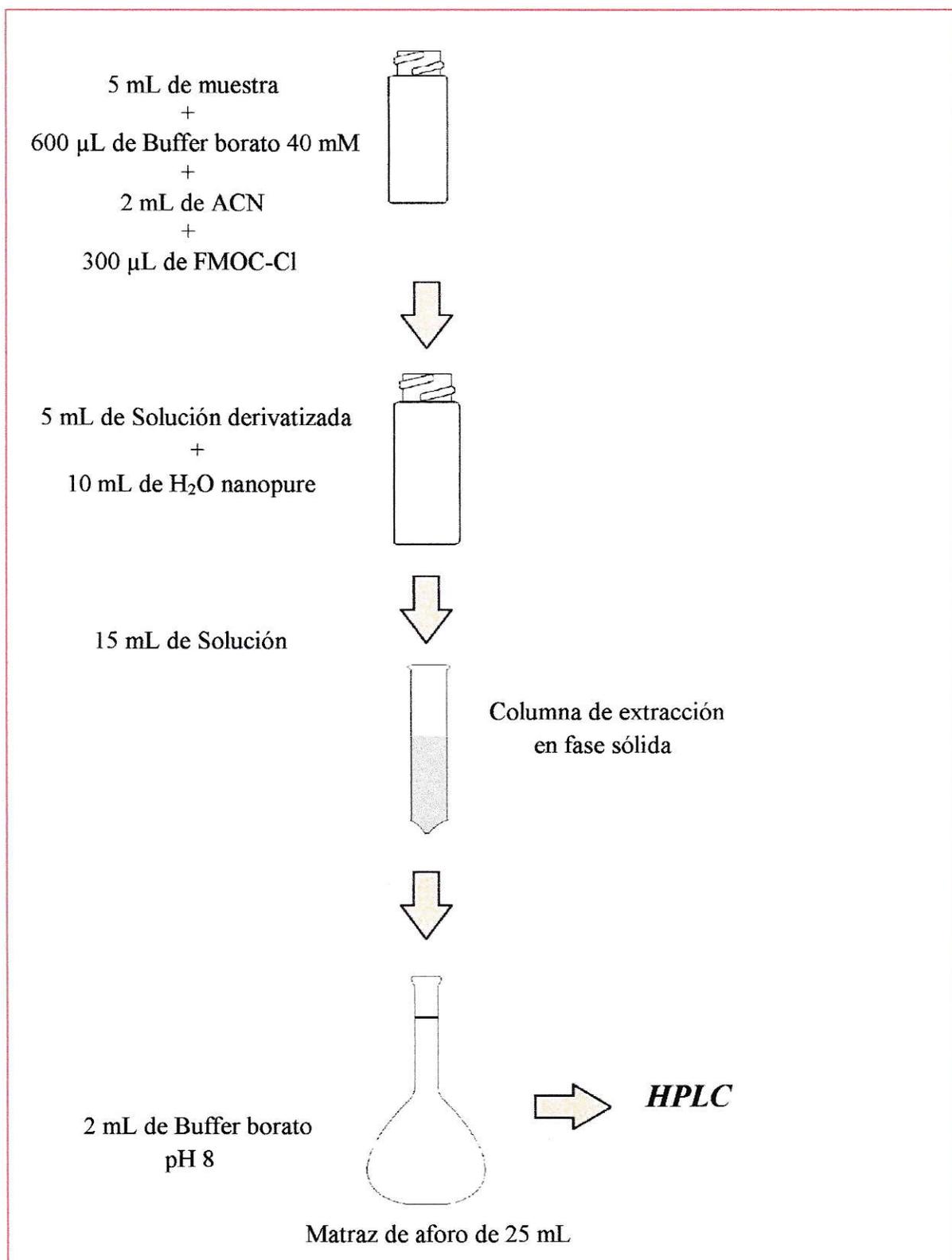


Figura 18. Metodología para la determinación de GPS y AMPA por HPLC-FLD

3.4 Parámetros analíticos instrumentales

Para el cálculo de los parámetros analíticos se construyó una curva de calibración con ambos analitos. El intervalo utilizado fue entre 0,05 y 1,0 µg/mL. Se realizó en duplicado.

3.4.1 Linealidad y Sensibilidad

Para la obtención de estos parámetros se utilizó el rango de concentración más alto de la curva, entre 0,2 µg/mL a 1,0 µg/mL; fueron calculados a partir de las ecuaciones /1/ y /2/ obteniéndose la siguiente curva.

» Linealidad:

» *GPS*

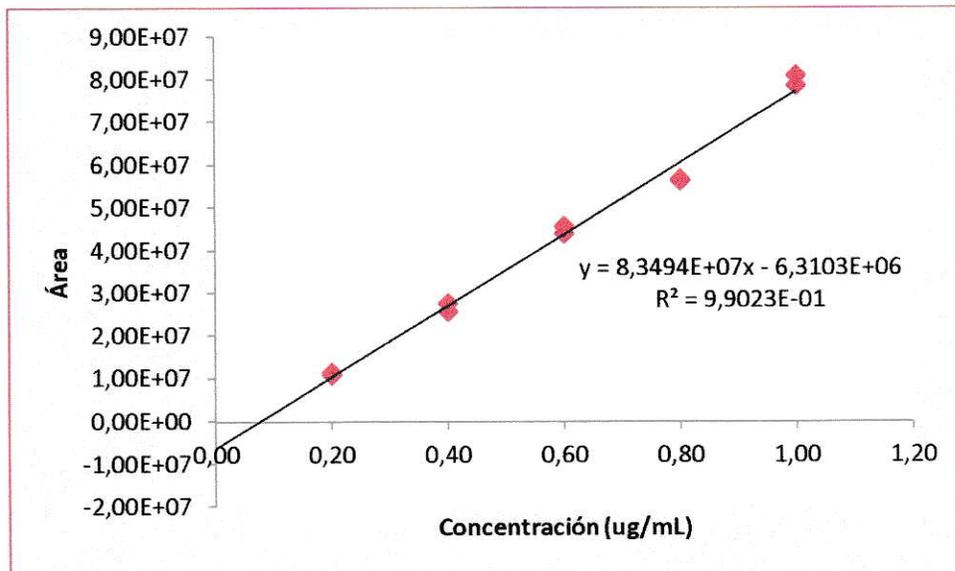


Figura 19. Curva de calibración para GPS

» AMPA

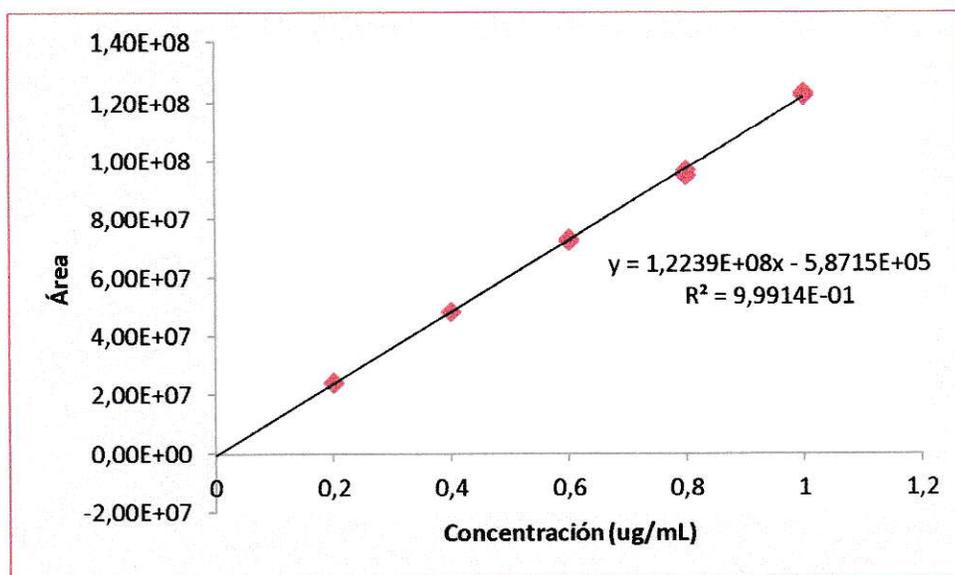


Figura 20. Curva de calibración para AMPA

En la siguiente tabla se encuentran las respuestas obtenidas desde el programa Excel para cada analito por regresión lineal: pendiente, intercepto, desviación estándar de la regresión, coeficiente de determinación, sensibilidad analítica y linealidad.

Tabla 16. Parámetros analíticos

Analito	R ²	Pendiente	Intercepto	Sb	Sensibilidad (µg/mL)	Linealidad
GPS	0,99	8,35x10 ⁷	-6,31x10 ⁶	2,93x10 ⁶	0,031	0,964
AMPA	0,99	1,22x10 ⁸	-5,87x10 ⁵	1,27x10 ⁶	0,009	0,989

3.4.2 Límite de Detección y Cuantificación

Para la obtención de estos parámetros se utilizó el rango de la curva más bajo, entre 0,05 µg/mL a 0,2 µg/mL; fueron calculados a partir de la ecuaciones /3/ y /4/ obteniéndose la siguiente curva.

» *GPS*

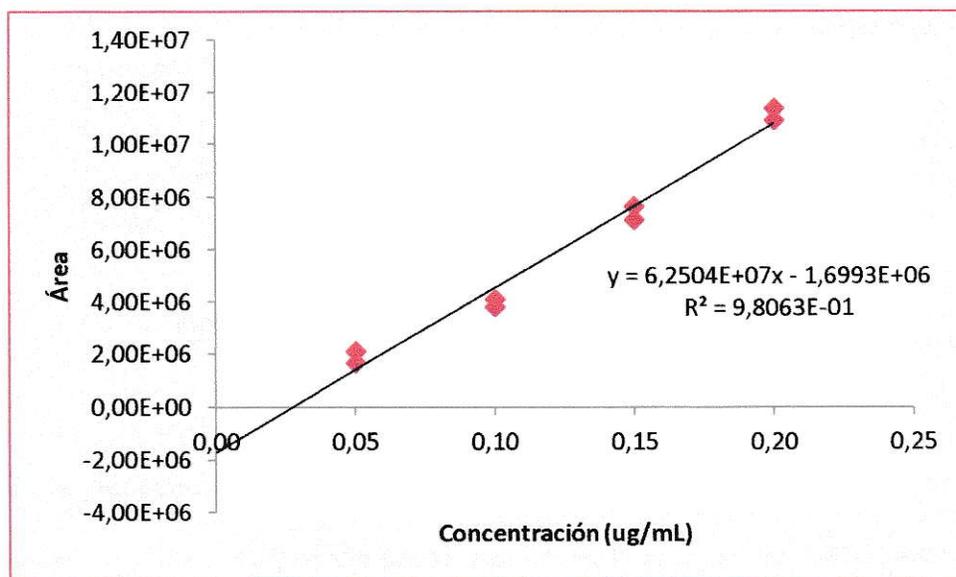


Figura 21. Curva de calibración para GPS

» AMPA

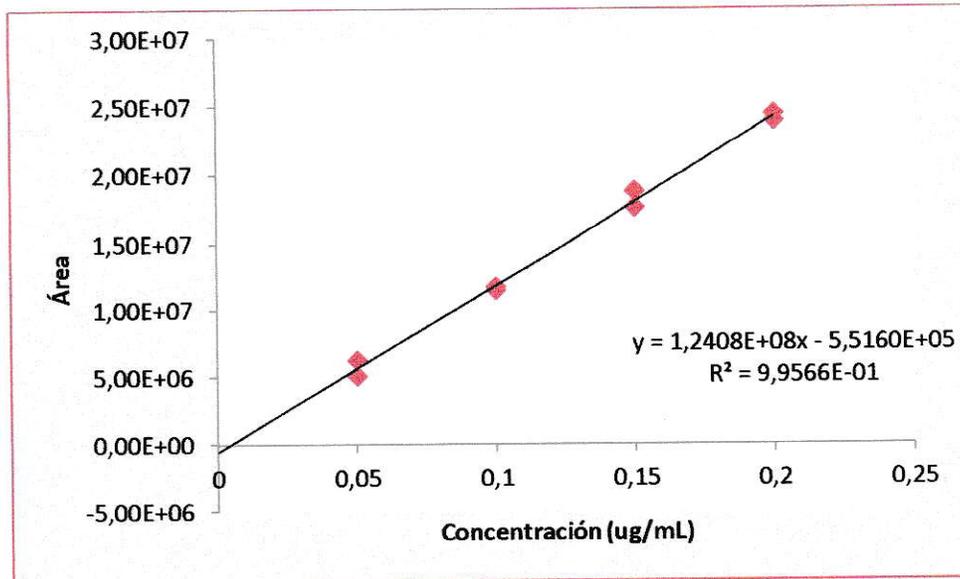


Figura 22. Curva de calibración para AMPA

En la siguiente tabla se encuentran las respuestas obtenidas desde el programa Excel para cada analito por regresión lineal: pendiente, intercepto, desviación estándar de la regresión, coeficiente de determinación, sensibilidad analítica y linealidad.

Tabla 17. Parámetros analíticos

Analito	R ²	Pendiente	Intercepto	Sy/x	N	LDD (µg/mL)	LDC (µg/mL)
GPS	0,98	6,25x10 ⁷	-1,69x10 ⁶	5,67x10 ⁵	8	0,025	0,083
AMPA	0,99	1,24x10 ⁸	-5,52x10 ⁵	5,29x10 ⁵	8	0,011	0,039

3.4.3 Límite de Detección y Cuantificación experimental

Para el cálculo de estos parámetros se realizaron 10 mediciones de una solución de concentración 0,02 $\mu\text{g/mL}$ de GPS y 0,01 $\mu\text{g/mL}$ de AMPA; además de una curva de calibración entre 0,02 y 0,1 $\mu\text{g/mL}$. Las concentraciones fueron establecidas en base a los límites de detección calculados por regresión lineal. Los resultados obtenidos son los siguientes

Tabla 18. Parámetros analíticos instrumentales

Analito	LDD ($\mu\text{g/mL}$)	LDC ($\mu\text{g/mL}$)
GPS	0,00069	0,0023
AMPA	0,00062	0,0021

3.5 Aplicación del método de derivatización

De acuerdo a los buenos resultados de los parámetros de calidad analítica del método se aplicó éste en el estudio del comportamiento de adsorción de GPS y AMPA en tres suelos obteniéndose las constantes de adsorción a partir de las correspondientes isotermas. Para ello se realizó previamente un estudio de las posibles interferencias de la matriz para cada suelo como también de las provenientes de los posibles electrolitos a utilizar además de un estudio exploratorio respecto de la capacidad de adsorción de los suelos.

3.5.1 Estudio de interferencias de matriz con electrolito soporte

De acuerdo a la literatura GPS podría formar complejos con compuestos presentes en muestras de aguas naturales contaminadas a niveles residuales. La reacción implicaría al grupo amino del analito, por lo que no se encontraría disponible para la reacción de derivatización. (Ibañez y col, 2006). Una investigación acerca de la influencia teórica y experimental de los cationes sobre ambos analitos en la reacción de derivatización con FMOC-Cl, indica que cationes monovalentes no presentan interferencias relevantes en las concentraciones que se utilizaron (hasta 500 mg/L); por el contrario en presencia de cationes polivalentes se observaron interferencias importantes para GPS; en cambio para AMPA fueron más débiles (Freuze y col, 2007).

En vista de los antecedentes expuestos se planteó la necesidad de un estudio previo de interferencias considerando que en general las isotermas se realizan utilizando como electrolito soporte CaCl_2 0,01M o KCl de la misma concentración. El estudio se realizó con soluciones de ambas sales en presencia y ausencia de la matriz del suelo, con el objetivo de observar posibles interferencias surgidas de la extracción de distintos cationes (por ejemplo Fe, Cu o Zn) o de compuestos orgánicos solubles que puedan reaccionar con el agente derivatizante, además de establecer el posible efecto quelante del catión presente en el electrolito soporte. El rendimiento de la reacción, expresado en porcentaje, se obtuvo utilizando como 100% un patrón de GPS-AMPA 1,0 $\mu\text{g/mL}$ acuoso.

Los porcentajes obtenidos para la reacción de derivatización, realizada en presencia de calcio fueron 39,9% para GPS y 6,73% para AMPA. Estos valores indican

que efectivamente este catión, estaría formando complejos, por lo que ambos analitos no se encuentran completamente disponibles para la reacción con FMOC-Cl. Al contrario de lo señalado por Freuze y col. (2007), los valores más bajos se obtienen para AMPA y no para GPS.

En el caso de la derivatización realizada en presencia de potasio, los porcentajes obtenidos fueron 98,57% para GPS y de 97,91% para AMPA. Estos valores indican que no existe interferencia por parte del catión, concordando con los resultados de la literatura.

En la tabla 19 se observa que los suelos Collipulli y Santa Luisa no presentan interferencias que pudiesen afectar la reacción de los analitos con FMOC-Cl ya que los porcentajes obtenidos en el rendimiento de la reacción son cercanos al 100%. Por otro lado los porcentajes obtenidos para el suelo Comalle indican una pequeña interferencia para GPS pero no para AMPA

Tabla 19. Rendimiento de la reacción de derivatización en estudio de interferencias de electrolito soporte y de la matriz suelo.

	Sin matriz		Suelo Collipulli		Suelo Comalle		Suelo Santa Luisa	
	Rendimiento de la reacción de derivatización (%)							
	GPS	AMPA	GPS	AMPA	GPS	AMPA	GPS	AMPA
H₂O	100,0	100,0	105,35	96,98	92,49	103,21	104,05	115,21
	100,0	100,0	100,28	96,42	93,16	103,07	103,17	114,74
KCl	97,43	97,57	98,23	75,73	61,52	48,95	93,05	73,14
	99,72	98,24	100,28	77,55	62,13	47,39	91,79	73,49
CaCl₂	37,00	7,01	50,34	8,04	31,63	9,77	47,57	2,70
	42,87	6,46	51,39	7,97	32,09	9,42	43,41	1,23

3.5.2 Estudio preliminar de adsorción

Los resultados del estudio preliminar de adsorción de ambos compuestos sobre los suelos Collipulli, Comalle y Santa Luisa se encuentran en la tabla 20.

Se observa que la retención de los analitos en el suelo en orden decreciente es Collipulli > Comalle > Santa Luisa. De acuerdo a estos resultados se plantearon las condiciones analíticas que se considerarían para las isotermas de adsorción, en función de los límites de detección y cuantificación del método y de su linealidad. A partir de este estudio preliminar se concluyó que las soluciones en equilibrio de los estudios de adsorción del suelo Santa Luisa debían diluirse previo a la derivatización. Dicha situación no se produce en el suelo Collipulli donde por su gran capacidad de adsorción, la concentración de ambos analitos en la solución en equilibrio será mucho menor.

Tabla 20. Cantidad de analito adsorbido en el suelo

Suelo	GPS		AMPA	
	Adsorbido ($\mu\text{g/g}$)	% Adsorbido	Adsorbido ($\mu\text{g/g}$)	% Adsorbido
Collipulli	498,74	99,74	496,43	99,05
	498,54	99,70	496,28	99,01
Comalle	483,30	96,66	457,56	91,51
	481,94	96,38	445,21	89,04
Santa Luisa	443,58	88,71	424,70	84,94
	444,03	88,80	426,89	85,37

3.5.3 Isotermas de adsorción

La interacción de GPS y AMPA con las partículas que componen el suelo se asocia a su pequeña estructura constituida por tres grupos funcionales polares. La fuerza con que los analitos son retenidos, también depende de las características del suelo como contenido de arcilla, tipo y contenido de minerales, contenido de materia orgánica, pH y capacidad de intercambio catiónico. Comúnmente, los estudios de adsorción se realizan variando la concentración de la sustancia cuya adsorción se investiga, manteniendo constante la temperatura en que ocurrirá la reacción y la cantidad de adsorbente. Las curvas obtenidas son llamadas isotermas.

Los resultados obtenidos indican que las curvas de adsorción, para los tres suelos, presentan un buen ajuste al modelo empírico de Freundlich con coeficientes de determinación (R^2) comprendidos entre 0,9728 y 0,9957.

Según Gimsing y Borggaard (2002) existe una correlación entre la cantidad de materia orgánica presente en el suelo y la adsorción de GPS, lo que es concordante con el estudio realizado debido a que el suelo Collipulli es el que presenta el mayor porcentaje de carbono orgánico (3,87%) y es el que mostró la mayor capacidad de adsorción para este analito; en contraste la más baja adsorción se encontró para el suelo Santa Luisa quien presenta el menor contenido de materia orgánica. Por otra parte se ha atribuido la gran adsorción de GPS a la presencia de caolinita, principal compuesto cristalino del suelo Collipulli (Cáceres-Jensen y col, 2009).

Un descriptor de gran importancia para evaluar el comportamiento de adsorción de un contaminante orgánico en un suelo es el valor de K_{OC} . Este permite determinar la influencia de la materia orgánica en el proceso de adsorción de un determinado plaguicida y se considera como un coeficiente que normaliza el valor de K_f o K_d al contenido de carbono orgánico. Los valores diferentes de K_{oc} en distintos suelos tanto para GPS como para AMPA presentados en la tabla 21, pueden atribuirse a que los analitos no fueron adsorbidos solamente por la materia orgánica, sino que también influyen los componentes inorgánicos presentes, como se ha mencionado anteriormente. En los gráficos 23-27 se ilustra el comportamiento de los dos compuestos en los tres suelos en estudio.

Tabla 21. Valores de coeficientes de Freundlich (K_f y $1/n$) y coeficiente de carbono orgánico para la adsorción de los analitos en los suelos (K_{OC})

Suelo	GPS			AMPA		
	K_f	$1/n$	K_{oc}	K_f	$1/n$	K_{oc}
Collipulli	863,32	0,7867	22308,0	609,29	0,806	15743,9
Comalle	214,07	0,5208	15290,71	140,68	0,5783	10048,57
Santa Luisa	61,65	0,6461	6514,75	39,55	0,8199	3241,8

- *Suelo Collipulli*

» *GPS*

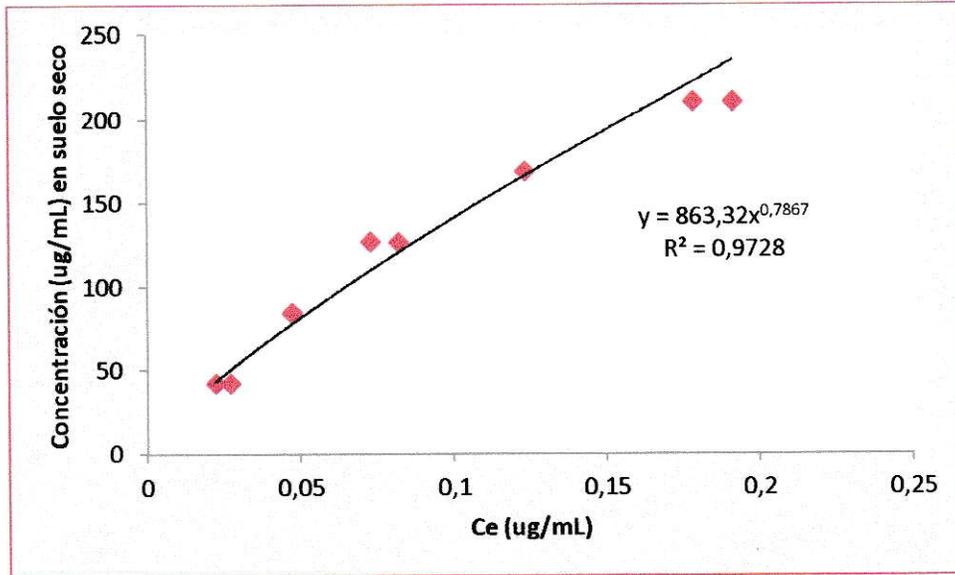


Figura 23. Isotherma GPS en suelo Collipulli

» *AMPA*

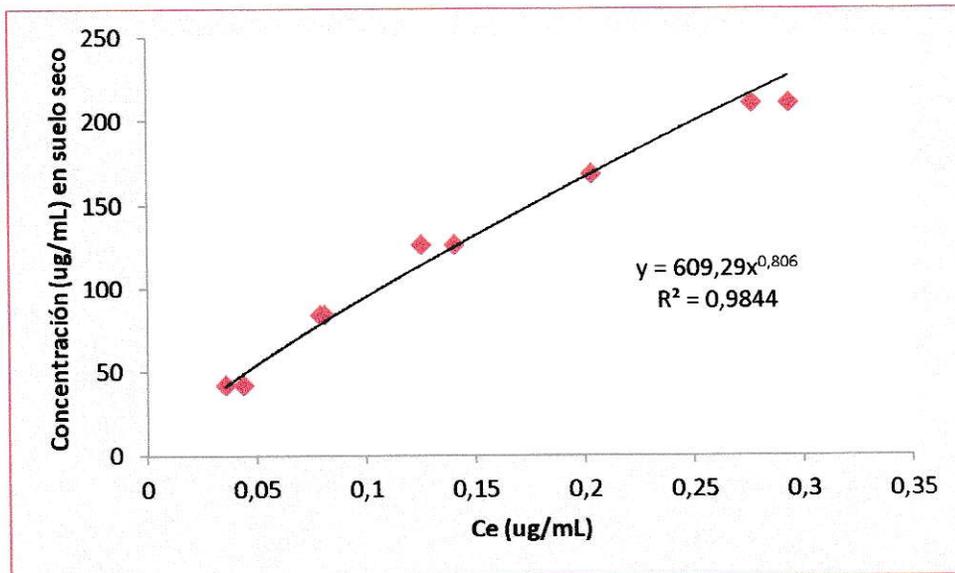


Figura 24. Isotherma AMPA en suelo Collipulli

- *Suelo Comalle*

» *GPS*

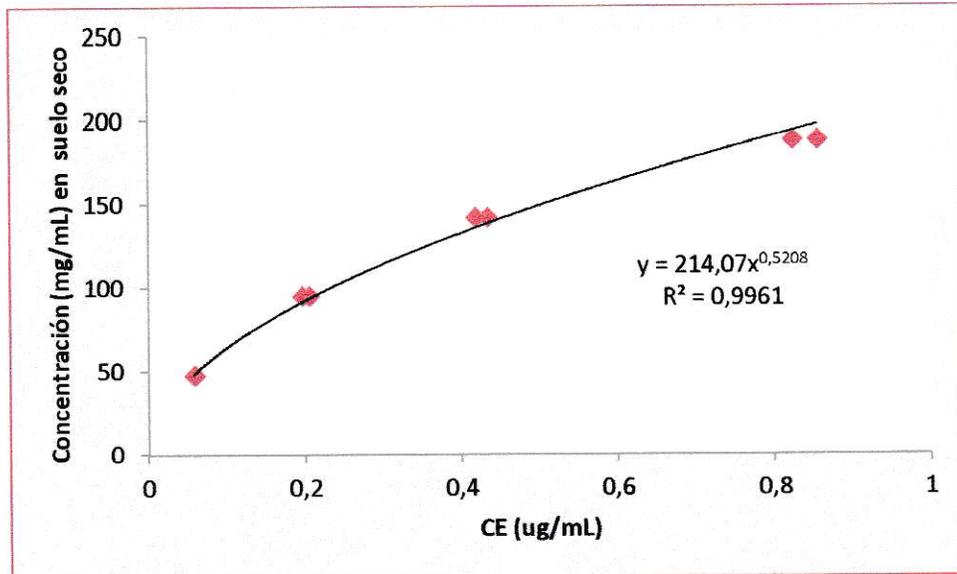


Figura 25. Isotherma GPS en suelo Comalle

» *AMPA*

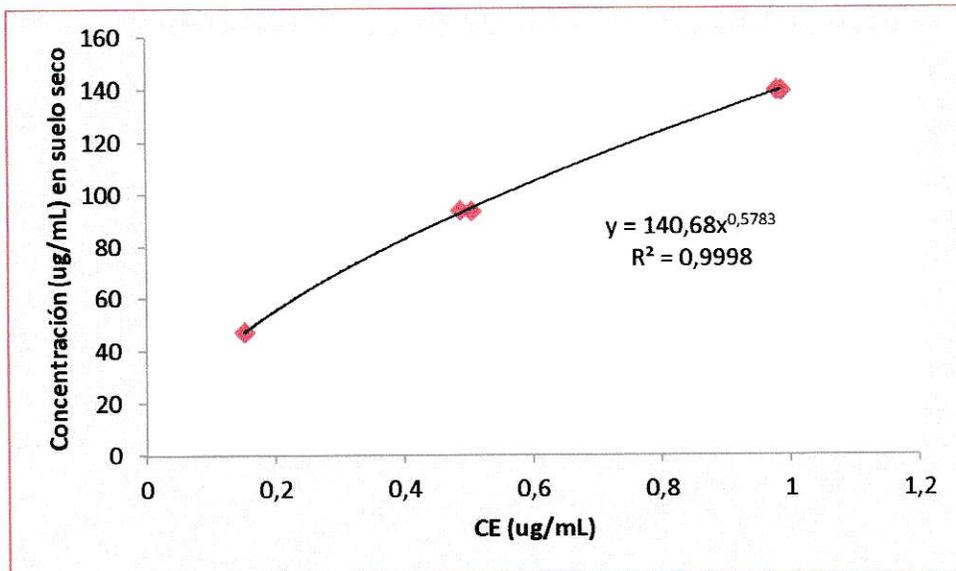


Figura 26. Isotherma AMPA en suelo Comalle

- *Suelo Santa Luisa*

» *GPS*

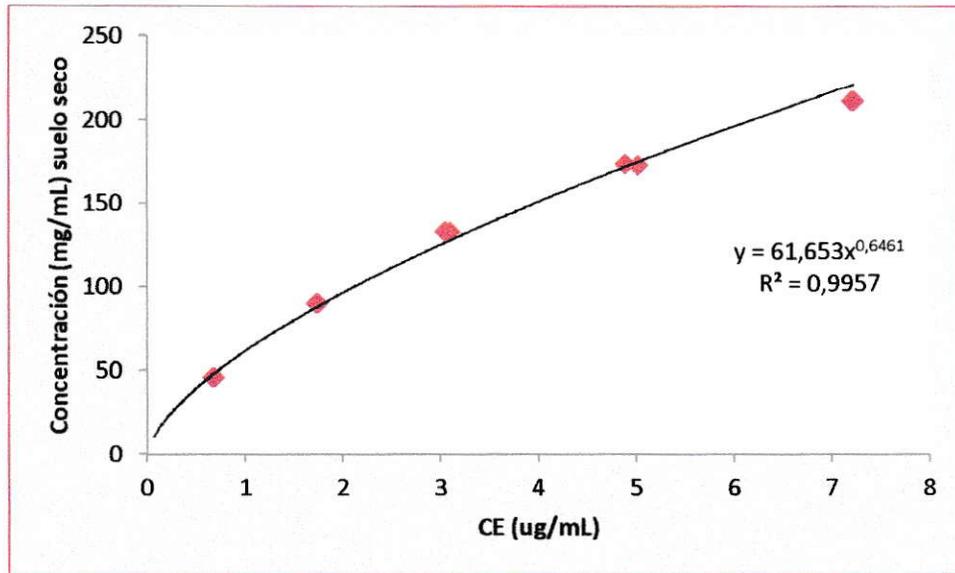


Figura 27. Isotherma GPS en suelo Santa Luisa

» *AMPA*

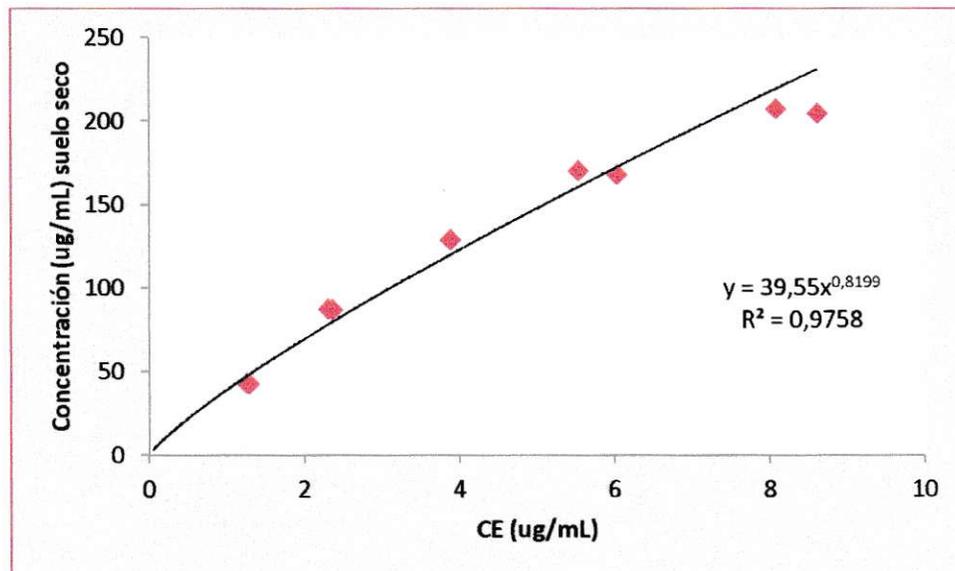


Figura 28. Isotherma AMPA suelo Santa Luisa

3.6 Estudio preliminar de Extracción

Los resultados del estudio de adsorción en suelos demuestran que estos retienen una gran cantidad tanto de GPS como AMPA. Estos dos compuestos de acuerdo a los antecedentes obtenidos en el laboratorio (Cáceres-Jensen y col. 2009), son fuertemente retenidos en suelos de origen volcánico, como también ocurre con suelos de otra naturaleza.

La extracción asistida por microondas ofrece una gran reducción en el tiempo de trabajo y consumo de disolventes, además de un alto rendimiento. Sin embargo para lograr una extracción con buenos porcentajes de recuperación se requiere de un estudio preliminar que permita establecer los factores que podrían influir en la metodología. En este trabajo se optó por realizar un estudio multifactorial que consideró el efecto simultáneo de los factores a través del diseño experimental. Para este estudio se seleccionó el suelo Santa Luisa.

3.6.1 Diseño exploratorio

Se realizó un diseño exploratorio (“Screening”) en donde los factores a estudiar fueron: potencia y tiempo de aplicación de microondas, solución extractante, pH del extractante y gramos de suelo utilizado.

En el suelo la adsorción de GPS se ve influenciada por la presencia del anión fosfato, porque ambos compiten por los sitios de adsorción (Borggard y Gimsing, 2008). El fosfato juega un papel fundamental en la determinación de la biodisponibilidad y lixiviación de GPS en el suelo, y en algunos casos es capaz de desorber completamente el analito. El uso de K_2HPO_4 0,1 M como extractante co-extrae una baja cantidad de materia orgánica en comparación con otras soluciones como por ejemplo la solución de $(NH_4) H_2PO_4$ (Venegas, 2011), por ello se seleccionó como uno de los extractantes. De acuerdo a la literatura otros extractantes posibles son soluciones alcalinas de diferente concentración basadas en el uso de NaOH o KOH.

Para procesar los resultados del diseño experimental, expresados como porcentaje de recuperación de la cantidad de analito inicial se utilizó el programa computacional Statgraphics Centurion XV mediante ANOVA. En la tabla 22 se encuentra la matriz decodificada del diseño y los resultados obtenidos para cada experimento. En donde

A: potencia

B: tiempo

C: extractante

D: pH

E: gramos de suelo

Tabla 22. Matriz decodificada y respuestas del estudio exploratorio

N° Experimento	Matriz Decodificada					Porcentaje de Recuperación (%)	
	A	B	C	D	E	GPS	AMPA
1	400	5	K ₂ HPO ₄ 0,1 M	9	1	59,36	18,21
2	650	5	K ₂ HPO ₄ 0,1 M	9	1	75,90	31,45
3	400	10	K ₂ HPO ₄ 0,1 M	9	1	60,27	31,67
4	650	10	K ₂ HPO ₄ 0,1 M	9	1	13,69	3,89
5	400	5	KOH 0,2 M	9	1	3,32	0,29
6	650	5	KOH 0,2 M	9	1	3,12	0,601
7	400	10	KOH 0,2 M	9	1	3,97	0,68
8	650	10	KOH 0,2 M	9	1	1,58	0,21
9	400	5	K ₂ HPO ₄ 0,1 M	11	1	66,13	26,81
10	650	5	K ₂ HPO ₄ 0,1 M	11	1	73,51	37,26
11	400	10	K ₂ HPO ₄ 0,1 M	11	1	66,23	33,47
12	650	10	K ₂ HPO ₄ 0,1 M	11	1	18,25	7,21
13	400	5	KOH 0,2 M	11	1	6,22	1,14
14	650	5	KOH 0,2 M	11	1	4,28	1,02
15	400	10	KOH 0,2 M	11	1	4,57	1,57
16	650	10	KOH 0,2 M	11	1	3,88	1,01
17	400	5	K ₂ HPO ₄ 0,1 M	9	2	49,66	18,72
18	650	5	K ₂ HPO ₄ 0,1 M	9	2	49,93	22,59
19	400	10	K ₂ HPO ₄ 0,1 M	9	2	34,21	19,35
20	650	10	K ₂ HPO ₄ 0,1 M	9	2	5,33	0
21	400	5	KOH 0,2 M	9	2	1,27	6,03
22	650	5	KOH 0,2 M	9	2	0,75	0
23	400	10	KOH 0,2 M	9	2	0,86	0
24	650	10	KOH 0,2 M	9	2	0,56	0
25	400	5	K ₂ HPO ₄ 0,1 M	11	2	40,6	17,25
26	650	5	K ₂ HPO ₄ 0,1 M	11	2	50,58	29,41
27	400	10	K ₂ HPO ₄ 0,1 M	11	2	41,62	25,28
28	650	10	K ₂ HPO ₄ 0,1 M	11	2	11,35	4,84
29	400	5	KOH 0,2 M	11	2	1,89	0
30	650	5	KOH 0,2 M	11	2	1,73	0,028
31	400	10	KOH 0,2 M	11	2	1,03	0
32	650	10	KOH 0,2 M	11	2	0,61	0

Del análisis de varianza se estableció que, exceptuando el pH, todos los factores son significativos para la extracción de GPS y en el caso de AMPA, solo la solución extractante y el tiempo de extracción.

A continuación se muestran las cartas de Pareto obtenidas para ambos analitos.

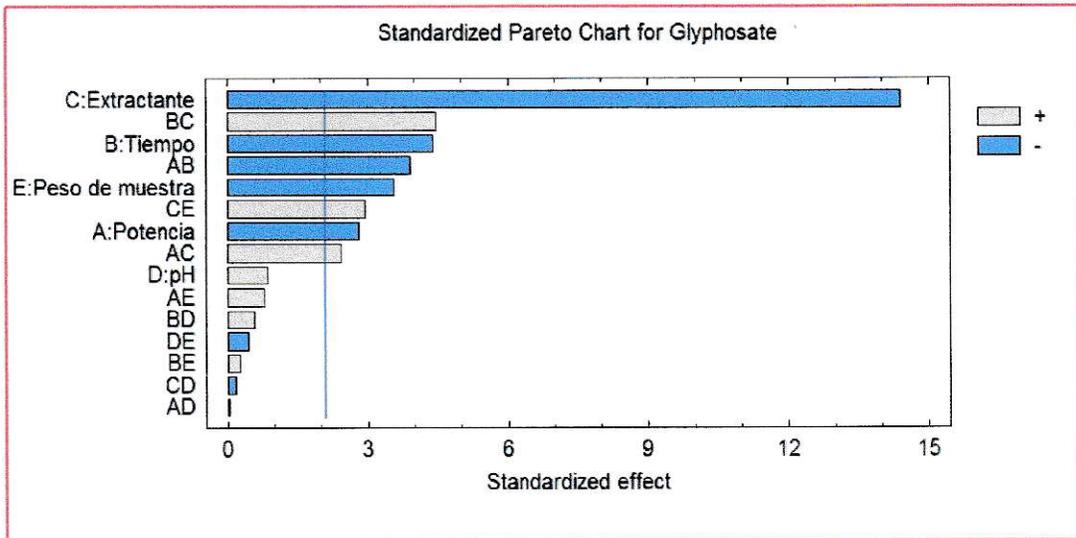


Figura 29. Carta de Pareto Estandarizada para GPS

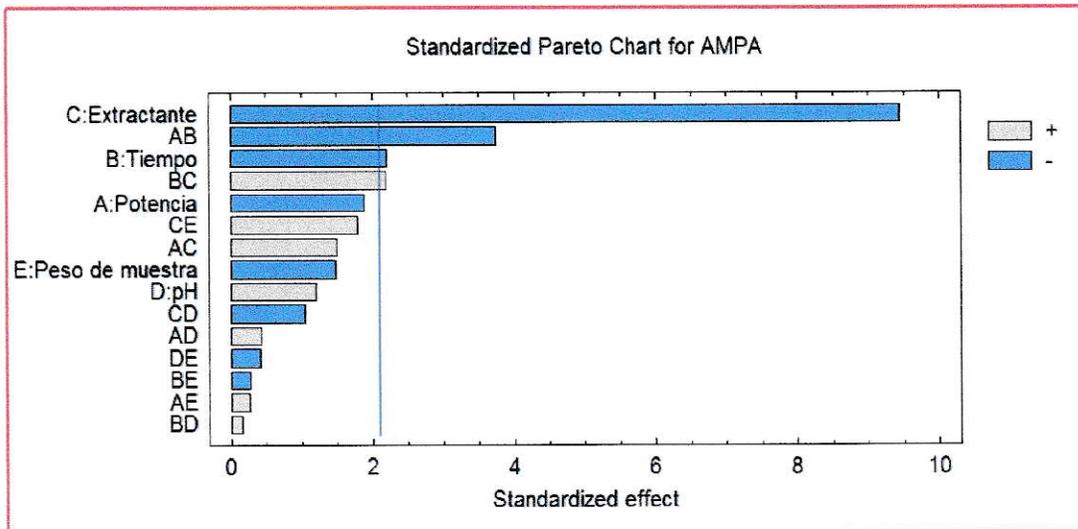


Figura 30. Carta de Pareto Estandarizada para AMPA

En la tabla 22 se observa que KOH en ninguna condición permite la extracción de GPS y su metabolito. De los resultados globales del estudio exploratorio se desprende el efecto negativo del tiempo de extracción, la potencia y del uso de una mayor cantidad de muestra. Es decir que incrementar la potencia y tiempo de extracción conduce a los menores porcentajes de recuperación. Sin embargo, los mayores porcentajes se obtienen para ambos compuestos a la mayor potencia y menor tiempo de exposición a las microondas es decir se observó una interacción significativa entre estos factores, siempre con el uso de fosfato como extractante. Por último se observa siempre una menor recuperación de AMPA en relación con GPS.

La extracción asistida por microondas es muy exhaustiva y el extracto, generalmente, contiene especies interferentes que deben ser eliminadas (Fuentes y col, 2007). Los resultados anteriores podrían explicarse por la extracción exhaustiva de componentes de la matriz que pudieran interferir en la reacción de derivatización.

La extracción incompleta o interferencias de la matriz son, por lo tanto, posibles causas de los bajos porcentajes de recuperación de ambos compuestos. Para dilucidar el origen se derivatizó un extracto del mismo suelo empleado para el diseño, fortificado con GPS y AMPA, comparando la respuesta con la obtenida para un estándar acuoso.

Los porcentajes de recuperación obtenidos fueron de 91% para GPS y de 48% para AMPA; es decir que los bajos porcentajes de AMPA, especialmente, no se deben al método de extracción sino a una interferencia que proviene desde la matriz de suelo que impide que los analitos sean derivatizados cuantitativamente. Estos resultados concuerdan con aquellos encontrados en los estudios de adsorción.

La extracción no es selectiva para GPS y AMPA, por lo que una variedad de compuestos pueden ser extraídos desde el suelo. De acuerdo a la literatura existe la posibilidad de que GPS y AMPA se presenten como agentes quelantes especialmente de algunos cationes y por lo tanto no estarían disponibles en la forma libre para la reacción de derivatización.

Existe un método para romper los complejos formados por los analitos y los componentes de la matriz extraídos que consiste en acidificar (~pH 1) y posteriormente neutralizar (~pH 9) la muestra previo a la derivatización (Ibañez y col, 2006).

En base a lo anterior se extrajeron GPS y AMPA utilizando como extractante KH_2PO_4 0,1 M a pH 9 y 11 y se compararon las recuperaciones resultantes de la variación del pH del extracto a condiciones altamente ácidas (pH~1) con aquellas obtenidas de las experiencias sin dicha variación.

Durante la acidificación del extracto de suelo se produjo la precipitación de la materia orgánica co-extraída, lo que permitió comparar nuevamente los resultados de la redisolución al llevar a pH 9 con los resultados de la eliminación del precipitado por centrifugación. Los porcentajes de recuperación de los analitos fueron muy bajos en todos los casos es decir que no solo existe la posibilidad de formación de complejos con cationes sino que presumiblemente habrían otros componentes de la matriz que llevarían a la formación de compuestos estables con los analitos al cambiar el pH del extracto, impidiendo su derivatización. La obtención de los mismos porcentajes de recuperación al eliminar la materia orgánica precipitada por centrifugación, no permite deducir que la pérdida de los analitos se relacione con la unión a la fracción soluble de la materia orgánica. Los porcentajes de recuperación obtenidos se muestran en la tabla 23.

Los porcentajes de recuperación obtenidos para el extracto que no fue sometido a cambios de pH fueron similares a los mayores porcentajes de recuperación obtenidos en el estudio exploratorio.

Tabla 23. Porcentaje de recuperación según tratamiento realizado

Tratamiento	Porcentaje de recuperación (%)	
	GPS	AMPA
Redisolución de la materia orgánica	14,71	0
Eliminación de la materia orgánica	14,0	0
Sin tratamiento	75,15	27,45

IV. CONCLUSIONES

- ✚ La reacción de derivatización de los analitos con FMOC-Cl y el método cromatográfico desarrollado permitió la determinación y cuantificación de GPS y AMPA con tiempos de retención cortos, buena resolución y eficiencia. Los límites de detección y de cuantificación calculados estadísticamente fueron 0,025 $\mu\text{g/mL}$ y 0,011 $\mu\text{g/mL}$ y 0,083 $\mu\text{g/mL}$ y 0,039 $\mu\text{g/mL}$ para GPS y AMPA, respectivamente. Por último la linealidad del método fue 0,964 y 0,989 para GPS y AMPA respectivamente.
- ✚ La extracción en fase sólida a través de Columnas C-18 resultó ser el método más apropiado para la eliminación del exceso de reactivo derivatizante sin afectar la cuantitividad del método.
- ✚ A partir del estudio de optimización se obtuvo que la cantidad de reactivo necesaria para la reacción es 160 $\mu\text{g/mL}$ en presencia de 25% de ACN y un tiempo mínimo de reacción de 120 minutos; además la presencia de AMPA afecta negativamente la derivatización de GPS.
- ✚ Las isotermas de adsorción de los tres suelos estudiados presentaron un adecuado ajuste al modelo de Freundlich encontrándose una adsorción creciente para Santa Luisa < Comalle < Collipulli claramente relacionada con el contenido de carbono orgánico de cada suelo.
- ✚ A partir del método de extracción basado en las microondas, se observó que los mayores porcentajes de recuperación se obtuvieron a 600 W de potencia, 5

minutos de extracción y extractante K_2HPO_4 a pH 9. Bajo estas condiciones la recuperación fue de 75,90% para GPS y 31,45 para AMPA.

V. REFERENCIAS

- › BORGGAARD O. and Gimsing A. "Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review", *Pest Management Science*, vol. 64. 441 – 156, 2008.
- › BURGER, Mabel y Fernández, Salome. Exposición al herbicida GPS: aspectos clínicos toxicológicos. Uruguay 2004 <<http://www.ceuta.org.uy/files/GPS.pdf>> [consulta 09 de septiembre de 2012].
- › CÁCERES-JENSEN L., Gan J., Báez M., Fuentes R., and Escudey M., "Adsorption of Glyphosate on Variable-Charge, Volcanic Ash-Derived Soils". *J. Environ. Qual.* 38, 1449 - 1457, 2009.
- › CORBERA M., Hidalgo M., and Salvado V. "Extraction and Preconcentration of the Herbicide Glyphosate and its Metabolite AMPA Using Anion-Exchange Solid Phases". *Microchimica Acta*. Vol. 153. 203 - 209, 2006.
- › Declaración de ventas de plaguicida años 2004, 2005, 2006, 2007 y 2008. Subdepartamento de Plaguicidas y Fertilizantes. División de Protección Agrícola Santiago-Chile. Gobierno de Chile Ministerio de Agricultura. SAG. 2008
- › DECRETO LEY N°3557. DISPOSICIONES SOBRE PROTECCIÓN AGRICOLA. Ministerio de Agricultura de Chile. Diario Oficial del 9 de febrero de 1981.
- › DE MIRANDA S., Másini J. "Developing a fluorometric sequential injection methodology to study adsorption/desorption of glyphosate on soil and sediment samples". *Microchemical Journal*. Vol. 98. 260 – 266, 2011.
- › FREUZE I., Jadas-Hecart A., Royer A, Communala P., "Influence of complexation phenomena with multivalent cations on the analysis of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water". *Journal of Chromatography A*. Vol. 1175. 197 – 206, 2007.
- › FUENTES EDWAR, Báez María E., Labra R. "Parameters affecting microwave-assisted extraction of organophosphorus pesticides from agricultural soil". *Journal of Chromatography A*. Vol. 1169. 40 – 46, 2007.
- › GARCÍA DE LLASERA M.P., Gómez-Almaraz L., Vera-Ávila L.E., Peña-Álvarez A. "Matrix solid-phase dispersion extraction and determination by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection of residues of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in tomato fruit". *Journal of Chromatography A*. Vol. 1093. 139 – 146, 2005.
- › GIMSING A.L., Szilas C., Borggaard O.K. "Competitive adsorption and desorption of glyphosate on clay silicates and oxides". *Clay Minerals*, 37, 509 – 515, 2002.

- › HANKEL I., & Singer H. & Hollender J. Ultratrace-level “Determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection”. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Vol. 391. 2265 – 2276, 2008.
- › IBAÑEZ M., Pozo O., Sancho J., Lopez F., Hernandez F. “Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry”. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1081. 145 – 155, 2005.
- › IBAÑEZ M., Pozo O., Sancho J., Lopez F., Hernandez F. “Re-evaluation of glyphosate determination in water by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry”. *Journal of chromatography A*, 51 – 55, 2006.
- › LEE E. A., Zimmerman L. R, Bhullar B. S. and Thurman E. M., Linker-Assisted Immunoassay and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for the Analysis of Glyphosate”. U.S. Geological Survey Open-File Report 01- 454, 13 p., 2002.
- › MILES Carl and H. Anson Moye: “Extraction of Glyphosate Herbicide from Soil and Clay Minerals and Determination of Residues in Soils”. *J. Agric. Food Chem.* 486 – 491, 1988.
- › NEDELKOSKA TV, Low GK-C “High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatization with 9-fluorenylmethylchloroformate” *Analytica Chimica Acta*. 145 – 153, 2004.
- › PIRIYAPITTAYA M., Jayanta S., Mitra S. and Leepipatpiboon N. Chromatography “Micro-scale membrane extraction of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water followed by high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with fluorescence detector”. *Journal of Chromatography A* 483 – 492, 2008.
- › SADZAWKA ANGELICA, Carrasco María Adriana, Grez Renato, Moro María de la Luz, Flores Hugo, Neaman Alexander. “Métodos de análisis recomendados para los suelos de Chile”. 2006
- › STALIKAS C., Konidari C. “Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides”. *Journal of Chromatography A*, 907, 1- 19, 2001.
- › TOMLIN, C.D.S., 2003. *The Pesticide Manual*, 13th ed.; British Crop Protection Council: 616 Alton, Hampshire, UK.
- › http://www.dne.gov.co/recursos_user/documentos/Doc_tecnicos/GPS.pdf [Consulta 2 de agosto de 2012].

› http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/94_eva/glyphos.pdf. La “Reunión Conjunta FAO/OMS sobre residuos de plaguicidas”. [Consulta 10 de agosto de 2012].

VI. ANEXOS

Anexo 1. Método cromatográfico

El número de platos teóricos se calcula mediante la siguiente expresión:

$$N = 16 * \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

Numero de platos teóricos = $16 * (t_r/w)^2$

Numero de platos teóricos para GPS = $16 * (542,22 \text{ s} / 15 \text{ s})^2$

Numero de platos teóricos para GPS = 20906,84

Numero de platos teóricos para AMPA = 19586,00

La resolución (R_s) corresponde es una medida cuantitativa para la separar dos picos analitos y se define como:

$$R_s = \frac{2 [(t_g)_y - (t_g)_x]}{W_x + W_y}$$

Donde:

$(t_g)_y$ = corresponde al tiempo de retención de la especie que se demora más en salir de la columna.

$(t_g)_x$ = corresponde al tiempo de retención de la especie que se demora menos en salir de la columna.

W_x y W_y = ancho de las dos especies en estudio.

Resolución = $2*(559,80 - 542,22)/(15 + 16)$

Resolución = 1,13

Anexo 2. Limpieza de la solución para la eliminación del exceso de FMOC-Cl

Cambio de solvente: se realizó una prueba en triplicado con una solución de 0,1 µg/mL de GPS-AMPA. El rendimiento de la reacción para GPS se calculó en base a un patrón de GPS-FMOC-Cl de 0,1 µg/mL de área.

Muestra	Área GPS ($\times 10^6$)	Área AMPA ($\times 10^7$)
1	9,8820	2,3563
2	9,4115	2,4245
3	8,4993	2,1457
<i>Desviación estándar</i>	<i>0,7030</i>	<i>0,1453</i>

Columna de extracción en fase sólida: se realizó una prueba en triplicado con una solución de 1,0 µg/mL de GPS-AMPA. El rendimiento de la reacción para GPS se calculó en base a un patrón de GPS-FMOC-Cl de 0,1 µg/mL de área.

Muestra	Área GPS ($\times 10^8$)	Área AMPA ($\times 10^8$)
1	0,97715	1,5702
2	1,0048	1,6177
3	1,0018	1,6165
<i>Desviación estándar</i>	<i>0,0152</i>	<i>0,0271</i>

Anexo 3. Estudio de interferencia de matriz con electrolito soporte

A continuación se presentan las respuestas cromatográficas obtenidas por HPLC-FD. El rendimiento de la reacción, expresada en porcentaje, se calcula a partir de un patrón (en duplicado) GPS-AMPA acuoso de 1,0 µg/mL que se denomina el 100%,

Patrón 1 GPS: $8,3507 \times 10^7$

Patrón 2 GPS: $8,4069 \times 10^7$

Promedio patrón GPS= $8,3788 \times 10^7$

Por ejemplo el área que se obtuvo para GPS en presencia de la matriz del suelo Collipulli fue $8,8273 \times 10^7$ por lo tanto el rendimiento de la reacción expresado en porcentaje se calcula de la siguiente manera

$$8,3788 \times 10^7 \rightarrow 100\%$$

$$8,8273 \times 10^7 \rightarrow x$$

El rendimiento de la reacción fue de un 105,35 % para estas condiciones

Anexo 4. Estudio preliminar de adsorción

El cálculo para determinar la cantidad de analito adsorbida en el suelo se realizó a partir de la solución puesta en contacto con este teniendo una concentración de 2,0 $\mu\text{g/mL}$ de donde se obtuvo la concentración en equilibrio.

Por ejemplo

Suelo collipulli

Área de GPS en la solución de 2,0 $\mu\text{g/mL}$: $5,2137 \times 10^7$

Área de GPS en la solución resultante luego del contacto con el suelo: $3,3024 \times 10^6$

$$2,0 \mu\text{g/mL} \rightarrow 5,2137 \times 10^7$$

$$x \rightarrow 3,3024 \times 10^6$$

La concentración en el equilibrio para este caso fue 0,126 $\mu\text{g/mL}$

Si se tienen 10 mL de solución entonces $0,126 \mu\text{g/mL} * 10 \text{ mL} = 1,26 \mu\text{g}$ de GPS quedan en solución. Por lo tanto si se agregó 500 μg de GPS menos la cantidad que queda en solución (1,26 μg) la cantidad de GPS adsorbida en el suelo es de 498,74 μg .

Anexo 5. Extracción

La cantidad extraída, se calcula a partir de un patrón GPS-AMPA acuoso de 0,91 $\mu\text{g/mL}$ correspondiente al 100%, de la misma forma que se hizo anteriormente.