

Utilización de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) para determinar consumo de sustrato

Romero Agostina^a, Escalada Juan Pablo^a, Bregliani Mabel^a y Pajares Adriana^{a,b}.
apajares@speedy.com.ar

a) UNPA-UARG Instituto de Tecnología Aplicada (ITA), Santa Cruz

b) Facultad de Ingeniería - UNPSJB, Chubut

Resumen: La incorporación de diferentes tipos de desechos industriales y hogareños, y muy especialmente de agroquímicos, son los principales motivos que pueden originar la contaminación de los ambientes naturales, esencialmente los cursos y cuerpos de agua natural. Los efectos nocivos pueden minimizarse merced a la fotodegradación, proceso que puede favorecerse por la adsorción de los contaminantes a arcillas naturales o modificadas con nanopartículas. En este último caso, para el estudio y seguimiento de la cinética de degradación de los contaminantes una técnica normalmente empleada es la cromatografía. En el caso particular del fenol, es posible aplicar la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, High Performance Liquid Chromatography). El presente trabajo se enfocó en la optimización de una técnica para el seguimiento de la adsorción y degradación de compuestos orgánicos, en particular fenol, mediante HPLC. Empleando un equipo Shimadzu CBM-20A, se obtuvo la mayor eficiencia con una corrida isotérmica a 25°C en columna Phenomenex Luna C18 (2) de 250 mm de longitud y 4,6mm de diámetro interno usando como fase móvil una mezcla 50/50 (V/V) acetonitrilo y agua ultrapura con un flujo de 1mL/min. Se empleó un detector espectrofotométrico UV (270 nm). La aplicación de la técnica con estos parámetros permitirán estudiar convenientemente los mecanismos de la fotodegradación del fenol adsorbido a arcillas modificadas con nanopartículas.

Palabras claves: HPLC; Fotodegradación; Fenol.

High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) used to determine substrate consumption

Romero Agostina^a, Escalada Juan Pablo^a, Bregliani Mabel^a y Pajares Adriana^{a,b}.
apajares@live.com.ar

a) UNPA-UARG Instituto de Tecnología Aplicada (ITA), Santa Cruz

b) Facultad de Ingeniería - UNPSJB, Chubut

Abstract: Dumping of industrial waste and household is the principal reason for natural ecosystems pollution, mainly water courses and bodies. A way to reduce the negative effects of many harmful products is photodegradation, which may be aided by the adsorption on natural clays or nanoparticles' modify-clays. In the last case, a technique commonly used to study and follow the kinetic of contaminants degradation is chromatography. In particular, for phenol analysis, it is possible to apply high performance liquid chromatography (HPLC). The present work was focus on the optimization of the HPLC technique for monitoring adsorption and degradation of organic compounds such as phenol. Using a Shimadzu CBM-20A, highest efficiency was obtained with an isothermal run at 25°C using Phenomenex Luna C18 (2) column, of 250 mm long and 4.6mm internal diameter. As movil phase it was used a mixture 50/50 (V/V) acetonitrile and ultrapure water with a flow of 1mL.min⁻¹. The detector was a UV-spectrophometer (at 270 nm). The application of the technique with these parameters, allows to properly elucidate the photodegradation mechanism of phenol when was adsorbed to nanoparticles' modified clays.

Keywords: HPLC; photodegradation; phenol.

INTRODUCCIÓN

Los ambientes naturales, especialmente los cursos y cuerpos de agua natural son susceptibles de ser contaminados debido a que en ellos pueden volcarse distintos tipos de desechos, industriales, hogareños y agrícolas. Entre estos productos podemos mencionar como relevantes los pesticidas. Cuando son aplicados a los campos para cumplir con su rol específico, se depositan en los suelos y luego son arrastrados por corrientes aéreas o de aguas de escorrentía para terminar suspendidos o disueltos en aguas superficiales. Este hecho por sí mismo constituye un problema grave, dado que muchos de estos compuestos son nocivos aun cuando se encuentren en muy pequeñas cantidades, no solamente confieren sabores y/u olores desagradables sino también en mayor o menor grado son tóxicos para la mayoría de los seres vivos. Esto es particularmente preocupante cuando alcanzan cuerpos de agua que son potenciales fuentes de provisión para consumo humano. El destino de un pesticida en la naturaleza puede ser descrito, dentro de un modelo simplificado, como una evolución a través de tres etapas relacionadas: inicialmente su adsorción por la materia orgánica o inorgánica del suelo, luego por un proceso de transferencia o movimiento pasa a otros entornos, hasta que finalmente se degrada.

Entre los procesos naturales de degradación se destacan aquellos que se producen merced a la participación de la radiación solar, por lo que se los denomina fotodegradación. Uno de los métodos para seguir la desaparición de los compuestos en estudio está basado en la propiedad que presentan la mayoría de los compuestos orgánicos de absorber radiación en el rango del ultravioleta o del visible. Es profusa la bibliografía existente de empleo de esta metodología en el estudio de los mecanismos de fotodegradación (Haag W. R, 1994; Escalada et al, 2006; Escalada et al, 2008)

Un método sencillo y atractivo por su alta eficiencia y fácil manejo para la eliminación de efluentes en fase acuosa que contienen fenol o sus derivados, es la adsorción. La viabilidad económica de estos procesos puede alcanzarse mediante la utilización de adsorbentes obtenidos de desechos. Estos adsorbentes pueden al mismo tiempo absorber radiación en el mismo rango que los contaminantes y además generar dispersión de luz debido a su característica física de presentarse en forma de partículas de cierto tamaño. Esto invalida el uso de técnicas de espectroscopía UV-vis para la determinación del pesticida debiendo aplicarse otro tipo de metodología. Con la finalidad de contar con una metodología que permita realizar el seguimiento de los procesos de fotodegradación de fenoles cuando son adsorbidos por nanopartículas de magnetita (NP) modificadas con arcilla y sustancias bio-orgánicas solubles (BOS), el presente trabajo tuvo como objetivo la aplicación de la cromatografía líquida de alta performance (HPLC) a este tipo de sistemas acuosos.

MARCO DE REFERENCIA

Nanotecnología

Si bien en el siglo XIX Michael Faraday (1875) había descrito las propiedades ópticas de metales en escala nanométrica, es en las últimas décadas cuando estos materiales han tomado mayor relevancia por las innumerables aplicaciones que día a día surgen, tanto industriales, ópticos, electrónicos, biomédicos e incluso ambientales (Benson et al, 2005; Carlos et al, 2012; Franks y Lange, 1996; González et al, 2014; Mitchnick et al, 1999). La nanotecnología manipula la materia en la escala de los nanómetros, es decir $10^{-9}\text{m} = 1\text{nm}$. Así las nanopartículas comprenden a aquellas partículas microscópicas de tamaños entre 1 y 100 nm (Horikoshi y Serpone, 2013). Su múltiples aplicaciones modernas, se deben a que las nanopartículas metálicas tiene propiedades físicas y químicas que las diferencian de los

metales a granel (Laurente et al, 2008). Por ejemplo, disminuye su punto de fusión, esto permite emplear pasta de nanopartículas de metales para imprimir las placas de los circuitos electrónicos. Sus propiedades ópticas dependen fuertemente del tamaño y forma de las partículas, lo cual les confiere distintos colores y por lo cual han encontrado aplicaciones como componentes de pinturas para distintos usos. En los últimos años ha recibido especial atención el empleo como absorbentes de nanomateriales de hierro con la finalidad de remediación ambientes contaminados con compuestos orgánicos o metales pesados (Auffan et al, 2007). Estos y muchos empleos actuales de las nanopartículas implica que puedan alcanzar los ambientes acuosos naturales. Los avances recientes sugieren que varios problemas relacionados con la calidad del agua podrían resolverse o mejorarse considerablemente mediante el empleo de productos que surjan del desarrollo de la nanotecnología. (Schulte J. 2005). En el desarrollo de nuevas tecnologías que emplean nanomateriales, un aspecto crítico a tener en cuenta es la composición superficial de los mismos, ya que de ella depende su selectividad y estabilidad en medio acuoso.

Separaciones cromatográficas

A comienzos del siglo XX el botánico ruso Michael Tswett, describió la separación de pigmentos de hojas verdes empleando una columna de carbonato de calcio utilizando el término cromatografía para describir las zonas coloreadas que se movían hacia abajo en la columna. A partir de ese momento, el desarrollo de esta técnica de separación ha sido constante.

Son técnicas muy versátiles que permiten la separación de distintos analitos de una mezcla que puede ser muy compleja. Se basa en la distribución selectiva de los solutos entre una fase móvil, -gaseosa, líquida o un fluido supercrítico- y una fase estacionaria líquida o sólida.¹ Entre estas técnicas la HPLC es una de las principales técnicas modernas de la química analítica. (Snyder L et al, 1979) Es una metodología altamente eficiente que tiene una gran resolución para un amplio rango de compuestos orgánicos, por este motivo es muy empleada en análisis ambientales (Fifield, 2000). Las separaciones pueden realizarse en unos pocos minutos, se basan en pasar la muestra a través de una fase estacionaria empaquetada en columnas de acero inoxidable relativamente cortas (no más de 25 cm) por las que se hace circular a elevada presión (200 bar) la fase móvil con flujos entre 1 y 3 cm³ min⁻¹. Las diferentes combinaciones de fases estacionarias y fases móviles determinan la separación y los tiempos de retención en la columna de los compuestos en la muestra. A la salida de la columna el eluato pasa por un detector que responde a la presencia de los distintos analitos y desarrolla una señal que es proporcional a su cantidad. Esta señal se grafica en función del tiempo demandado para la aparición de dicha señal, el cromatograma. Un detector común por su versatilidad es el basado en la absorción de la radiación UV por los analitos eluidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras sintéticas para el análisis y los estándares para las curvas de calibración se prepararon con fenol pro-análisis, Sigma-Aldrich Para el presente estudio las nanopartículas fueron preparadas en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), CCT-La Plata-CONICET de acuerdo a la metodología de Carlos et al., 2012. Para todas las soluciones y suspensiones se empleó agua bidestilada, calidad I preparada en el momento. Los nanomateriales utilizados fueron:

- M1: arcilla (montmorillonita) + Fe₃O₄ (Nanopartículas de magnetita).

- M2: arcilla (montmorillonita) + Fe₃O₄ (Nanopartículas de magnetita) + BOS (sustancias tipo húmicas aisladas de la basura). Preparación de magnetita en suspensión de arcilla y BOS.
- M3: arcilla (montmorillonita) + Fe₃O₄ (Nanopartículas de magnetita) + BOS (sustancias tipo húmicas aisladas de la basura). Se prepararon las nanopartículas de magnetita cubiertas con BOS y estas se mezclaron con la arcilla.

De cada nanomaterial se preparó una suspensión stock (2g/L) por agregado de las mismas al medio acuoso con agitación constante. A partir de las mismas se diluyeron 100 mL de cada suspensión a una concentración de 0,5g/L en solución de fenol 50µM las que se colocaron en un agitador a vaivén a una velocidad de 200 golpes por minuto asegurando así el buen contacto entre contaminante (fenol) y material adsorbente. Para seguir la cinética de la adsorción se tomaron muestras del sobrenadante a tiempos determinados hasta un máximo de 300 horas.

Las separaciones y cuantificaciones se realizaron en un equipo Shimadzu CBM-20A, con módulo dispenser de solventes LC-20AT, sistema degasificador en línea DGU-20A5 y detector UV-vis con arreglo de diodos SPD-M20A.

RESULTADOS

Tal como se mencionó, obtener una mejor separación y el tiempo de retención de las sustancias presentes en la muestra depende principalmente de la combinación de fase estacionaria-fase móvil que se emplee. La fase estacionaria más común consiste en partículas de silica porosa con largas cadenas hidrocarbonadas unidas químicamente por enlaces siloxano (Si-O-Si-R). Estas superficies modificadas con fase enlazada se las conoce como de fase reversa, entre ellas son muy empleadas la que presentan un grupo octadecil (C18). Este tipo de fase aprovecha la reactividad de los grupos silanoles presentes en la superficie para fijar moléculas orgánicas mediante enlaces covalentes, es así que el mecanismo de separación es por reparto (Rouessac y Rouessac, 2003). En este trabajo, se optó por trabajar con una columna de este tipo por la reproducibilidad de las separaciones y como parámetro variable emplear cambios en la fase móvil. La composición de la fase móvil se ajustó para optimizar su polaridad en relación a la del fenol. Se realizaron corridas con dos solventes de alta polaridad, metanol y acetonitrilo. En ambos casos se probaron mezclas con agua hasta encontrar aquella composición que brindó un poder de elución lo suficientemente fuerte para en corridas de 5 minutos permitiera obtener picos bien definidos sin la aparición de colas que dificulten la cuantificación. Las corridas fueron isotérmicas.

El detector con que cuenta el equipo empleado, por ser de arreglo de diodos, realiza al instante un barrido de las distintas longitudes de onda, en el gráfico tridimensional se puede apreciar que el fenol presenta un máximo de absorción a los 270 nm, por lo cual fue la longitud de onda seleccionada para su cuantificación.

Finalmente, la mejor resolución con la que se obtuvieron cromatogramas con picos bien definidos y con mayor sensibilidad para el fenol en un tiempo de corrida adecuado, se logró utilizando las siguientes condiciones:

- Volumen de inyección 20 µl
- Fase Móvil:
 - solución isocrática de Agua – Acetonitrilo 50:50 v/v
 - velocidad de flujo de 1,0 ml/min (Fig 1)
- Fase Estacionaria: columna Phenomenex Luna C18 (2) de 250 mm de longitud y 4,6mm de diámetro interno, 5 µm de tamaño de partícula, 100 Å de tamaño de poro, 400 m²/g. En el relleno de esta columna los ligandos octadecil silano están unidos a la superficie de sílice, dando lugar a una fase muy hidrofóbica de gran selectividad para

metileno. El endcapping no polar elimina, prácticamente, las interacciones con los silanos.

- Longitud de onda del detector: 270 nm.

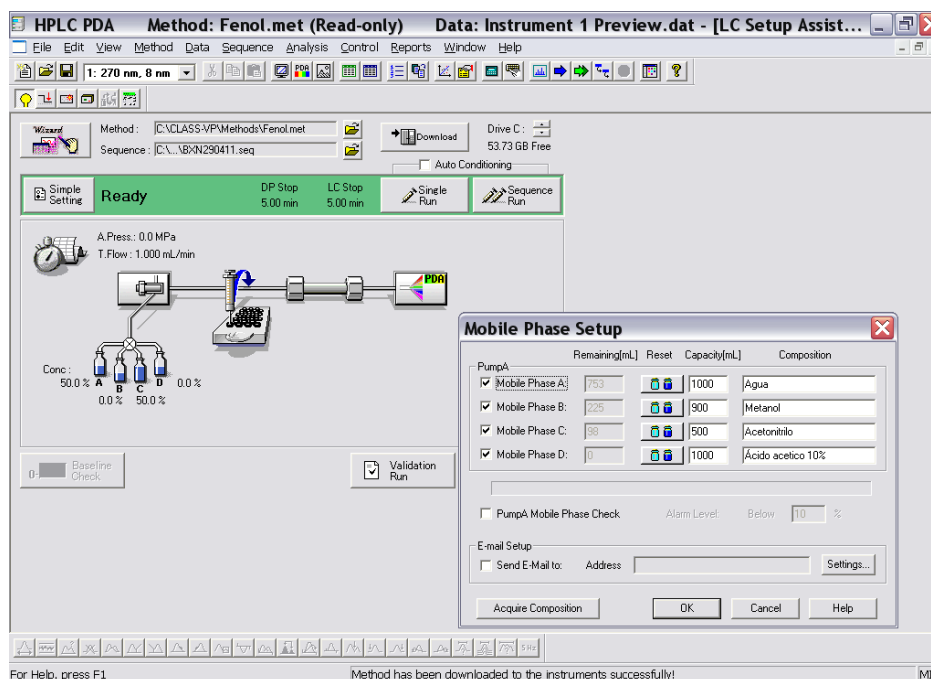


Fig 1: Carga de parámetros y programación del software.

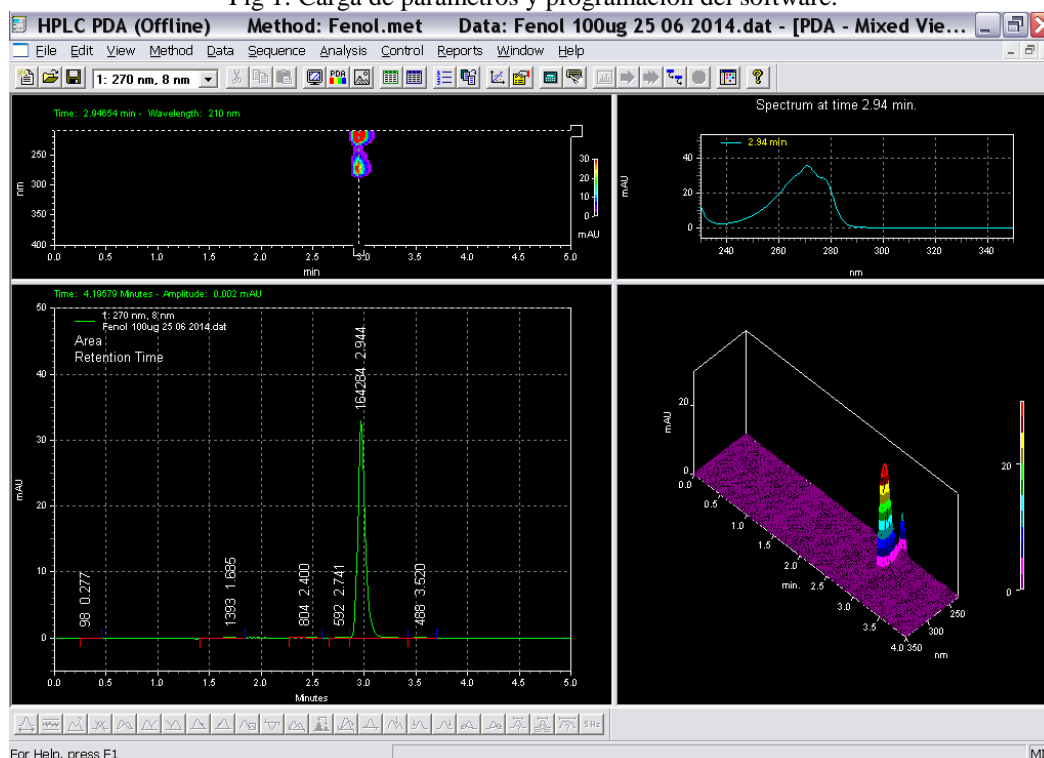


Fig 2: Cuadrante inferior izquierdo: Cromatograma de solución de fenol 100 μ g/L a 270 nm. Cuadrante superior derecho: espectro de absorción del fenol. Cuadrante superior izquierdo: Cromatograma bidimensional y Cuadrante inferior derecho: Cromatograma tridimensional que muestran la absorción a distintas longitudes de onda.

En estas condiciones se obtuvieron las curvas de calibración para la cuantificación de fenol. Las soluciones estándar de 5, 10, 20, 40, 60 y 100 μ M se inyectaron y se eluyeron por un tiempo total de 5 minutos. En estas condiciones, el tiempo de retención del fenol fue de 2,944

min. En dicho tiempo, se puede observar el espectro de absorción del compuesto (Fig 2). Las curvas estándar se construyeron representando el área del pico en función a la concentración (Fig. 3). Esta curva de calibración permitió calcular la cantidad de fenol en las soluciones problema (Fig 3).

Del mismo modo, se procedió con los extractos de las distintas suspensiones a distintos tiempos de contacto nanopartícula-fenol. Las nanopartículas se separaron previamente con la ayuda de un imán de neodimio. Para acondicionarlas para la corrida cromatográfica las muestras se filtraron por membranas millipore de 0,45 μm de poro, los resultados de estas muestras son motivo de otra publicación (Escalada et al, en prensa).

No se observaron interferencias en las corridas, obteniendo cromatogramas similares a los de la curva de calibración con idéntico tiempo de retención para el fenol no adsorbido por las nanopartículas. Por ello, se pudo establecer que la cromatografía en las condiciones que se seleccionaron como óptimas para nuestro sistema de análisis resultó adecuada para la cuantificación del fenol remanente en las suspensiones en que se emplearon los distintos nanomateriales como material adsorbente.

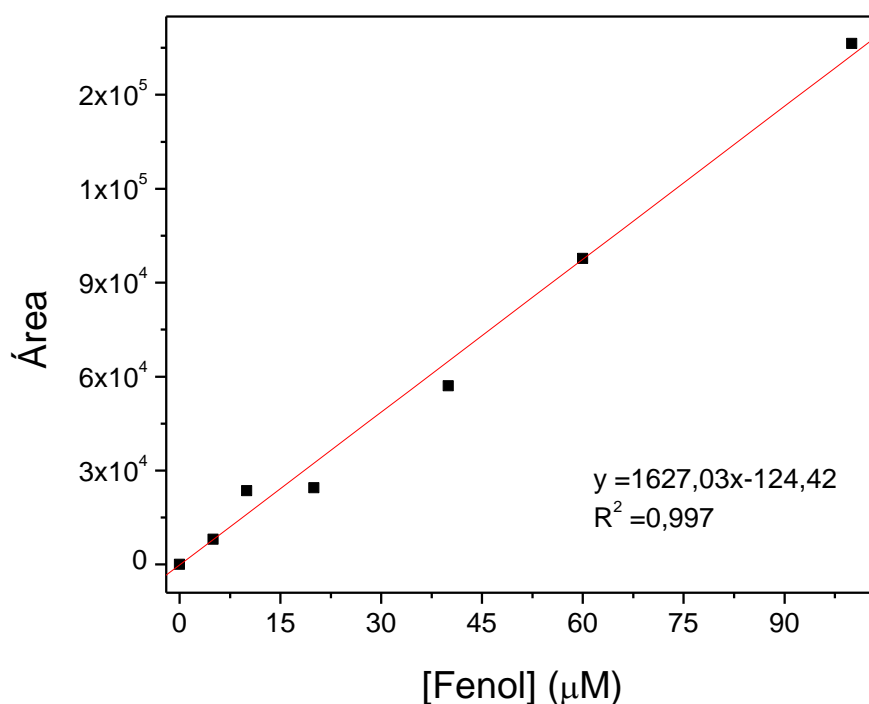


Fig 3: Grafica de área del pico cromatográfico ($t = 2,944$ min) vs concentración de fenol.

REFERENCIAS

- AUFFAN, M., H.J. SHIPLEY, S. YEAN, A.T. KAN, M. TOMSON, J. ROSE, J.Y. BOTTERO, Nanomaterials as adsorbents, in: M.R. WIESNER, J.Y. BOTTERO (Eds.), Environmental Nanotechnology: Applications and Impacts of Nanomaterials, McGraw-Hill, New York, 2007, pp. 371–392.
- BENSON, H., SARVEIYA, V., RISK, S. and ROBERTS, M. S. (2005) . "Influence of anatomical site and topical formulation on skin penetration of sunscreens. Therapeutics and Clinical Risk Management, 1 3: 209–218.
- CARLOS, LUCIANO, CIPOLLONE, M., SORIA, D. B., MORENO, M. S., OGILBY, P.R., GARCÍA EINSCHALAG, F.S., MÁRTIRE, D. (2012) The effect of humic acid

- binding to magnetite nanoparticles on the photogeneration of reactive oxygen species. *Separation and Purification Technology*. **91**, 23-29.
- ESCALADA, J. P. PAJARES, A. GIANOTTI, J. MASSAD, W. BERTOLOTTI, S. AMAT-GUERRI, F. GARCÍA, N. A. (2006), *Chemosphere*, 65, 237–244.
- ESCALADA, J. P. GIANOTTI, J. PAJARES, A. MASSAD, W. AMAT-GUERRI, F. GARCÍA, N. A (2008), *J. Agric. Food Chem.*, 56, 7355-7359.
- FARADAY, Michael (1857). Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Phil. Trans. Roy. Soc. London* 147: 145–181.
- FRANKS, G.V. and LANGE, F.F. (1996). Plastic-to-Brittle Transition of Saturated, Alumina Powder Compacts. *J. Am. Ceram. Soc.* 79 (12): 3161.
- GONZÁLEZ D., DE NICOLA, M., BRUNI, E., CAPUTO, F., RODRÍGUEZ, A.B., PARIENTE, J.A., GHIBELLI, L. (2014). Nanoceria protects from alterations in oxidative metabolism and calcium overloads induced by TNF α and cycloheximide in U937 cells: pharmacological potential of nanoparticles. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 397, 245-253.
- HAAG W. R. Aquatic and SURF. Photochem. Ed. G. HELZ, R. ZEP and D. CROSBY. (1994) CRC. Boca ratón
- FIFIELD, F. W. Separation techniques. *En: Environmental Analytical Chemistry*. Eds. F.W. Fifield and P. J. Haines. (2000). Blackwell Science Ltd. London.
- LAURENT, S., D. FORGE, M. PORT, A. ROCH, C. ROBIC, L. VANDER ELST, R.N. MULLER, Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications, *Chem. Rev.* 108 (2008) 2064–2110.
- MITCHNICK, MA; FAIRHURST, D; PINNELL, SR (1999). Microfine zinc oxide (Z-cote) as a photostable UVA/UVB sunblock agent. *Journal of the American Academy of Dermatology* **40** (1): 85–90.
- NOUBACTEP, C. The fundamental mechanism of aqueous contaminant removal by metallic iron, *Water SA* 36 (2010) 663–670.
- ROUESSAC, F., A. ROUESSAC. (2003) *Análisis Químico. Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas*. Mc Graw Hill/Interamericana. Madrid. España.
- SATOSHI Horikoshi and NICK Serpone. Introduction to Nanoparticles. *En Microwaves in Nanoparticle Synthesis, First Edition*. Edited by Satoshi Horikoshi and Nick Serpone. 2013 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- SCHULTE, J. and DUTTA, J. (2005), *Nanotechnology in environmental protection and pollution Sci. Technol. Adv. Mater.*, 6, 219–220.
- SNYDER L., KIRKLAND J.,(1979) “Introduction to modern Liquid Chromatography”, 2nd. Edition, J. Willey, N.Y.
- YAVUZ, C.T., J.T. MAYO, W.W. YU, A. PRAKASH, J.C. FALKNER, S. YEAN, L. CONG, H.J.SHIPLEY, A. KAN, M. TOMSON, D. NATELSON, V.L. COLVIN, Low-field magnetic separation of monodisperse Fe₃O₄ nanocrystals, *Science* 314 (2006) 964–967.
-