

**PUESTA A PUNTO DE UNA METODOLOGÍA POR MICRO-EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO  
DISPERSIVA ACOPLADA A DEMULSIFICACIÓN CON SOLVENTES PARA LA  
DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO  
2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO EN ORINA**

Borello, Julieta S.

Cañas, Ana I.

Lucero, Patricia A.

Centro de Excelencia en Productos y Procesos de Córdoba (CEPROCOR) - Córdoba -  
Argentina

Correspondencia: Julieta Borello. CEPROCOR. Sede Santa María de Punilla: Pabellón  
CEPROCOR (X5164) Teléfonos: (54-3541) 489651/53 Fax: (54-3541) 488181.  
[julietaborello@gmail.com](mailto:julietaborello@gmail.com)

Aceptado para su publicación: 17 de Octubre de 2016.

## RESUMEN

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es un herbicida hormonal auxínico del grupo de los fenoxiácidos. La exposición al 2,4-D puede ocurrir por las vías inhalatoria, digestiva y dermal. En el organismo humano sufre una limitada biotransformación y es eliminado inalterado por vía urinaria. Por lo tanto, los niveles urinarios de 2,4-D como ácido libre pueden ser usados como indicadores de exposición a este compuesto. El objetivo del trabajo fue la puesta a punto de un método por micro-extracción líquido-líquido dispersiva acoplada a demulsificación con solventes (SD-DLLME) para la detección del 2,4-D en orina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). A partir de las pruebas realizadas se estableció que las condiciones óptimas para extraer y pre-concentrar el analito son: temperatura de trabajo 18 °C, 7 mL de orina sin diluir, 750 µL / 750 µL de ACN como agentes dispersante/demulsificante y 75 µL de 1-octanol como agente extractante. La metodología de extracción demostró tener un límite de detección adecuado para evaluar exposición laboral además de ser simple, rápida, económica y amigable con el ambiente.

Palabras Claves: ácido 2,4-diclorofenoxiacético, orina, micro-extracción líquido-líquido dispersiva.

## INTRODUCCIÓN

Los herbicidas fenoxiácidos como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético, conocido habitualmente como 2,4-D, son inhibidores de crecimiento pre y post-emergentes ampliamente utilizados a nivel mundial. El 2,4-D se absorbe a través del tracto gastrointestinal, piel y pulmón. En el organismo humano sufre una limitada biotransformación y se excreta sin modificaciones principalmente por orina aproximadamente dentro de las 120 hs ( $t_{1/2}=13$  hs) y los niveles

urinarios están bien correlacionados con el grado de exposición. (1,2). Los datos de biomonitoreo de trabajadores muestran valores medios de 2,4-D en orina comprendidos entre 5 – 45 µg/L con valores máximos entre 410 – 2500 µg/L. (3)

En los métodos analíticos empleados para la evaluación de la exposición a plaguicidas se necesita un tratamiento de la muestra que garantice resultados confiables. Estos procedimientos tienen que ser simples y rápidos, y proporcionar la suficiente sensibilidad para detectar cantidades muy pequeñas de los analitos. (4)

La elección de la técnica analítica para la determinación de plaguicidas depende de una variedad de factores incluyendo costo, disponibilidad, selectividad, sensibilidad, propiedades del analito y factibilidad del análisis. La determinación del 2,4-D se puede realizar tanto por cromatografía gaseosa (CG) como por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con distintos detectores; la determinación por CG requiere un paso previo de derivatización para otorgarle a la molécula de 2,4-D estabilidad térmica, volatilidad y polaridad adecuadas para el análisis. La técnica de elección para identificar y cuantificar el 2,4-D en muestras biológicas es la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS-MS) que reúne el poder de separación proveniente del HPLC y la universalidad, selectividad y sensibilidad que aporta la espectrometría de masas como técnica de detección. (5,6)

La extracción líquido-líquido es una técnica tradicional que está basada en el equilibrio de distribución de los analitos entre dos fases líquidas inmiscibles puestas en contacto. La gran cantidad de variables que son posibles de modificar, la existencia de diversos solventes, la posibilidad de emplear mezclas de solventes, modificaciones del pH, etc. hacen de la extracción líquido-líquido convencional una técnica muy útil y versátil. Sin embargo, la formación de emulsiones, el manejo de volúmenes grandes de muestra y solventes, el empleo de solventes tóxico e inflamables, así como los riesgos de pérdidas o contaminaciones durante las distintas etapas hacen de ella una técnica costosa, lenta y además poco respetuosa del medioambiente. Por ello, en los últimos años, esta técnica ha sido desplazada por técnicas de extracción

miniaturizadas, evitando de este modo todos o al menos la mayor parte de estos inconvenientes. (7) En el año 2006 Assadi (8) y colaboradores desarrollaron un método de micro-extracción líquido-líquido dispersivo (DLLME) que tiene su fundamento en el uso de un sistema ternario de solventes. Los parámetros que se utilizan para caracterizar la eficacia de estas técnicas miniaturizadas son el factor de enriquecimiento (FE) y la recuperación (R). La DLLME puede ser acoplada con CG, HPLC y Espectroscopía de Absorción Atómica y ha sido aplicada al análisis de residuos de plaguicidas, metales pesados, hidrocarburos policíclicos aromáticos, etc. En una variante de la DLLME se separan las fases con la adición de una segunda porción del disolvente dispersor que actúa como un demulsificante. Esta variante se presenta como una muy buena alternativa para la determinación de 2,4-D en orina tal como lo proponen Behbahani M. y colaboradores. (8,9)

Varios factores afectan el proceso de extracción y pre-concentración: temperatura, centrifugación, dilución de la orina, tipo y volumen de los solventes extractante, dispersante y demulsificante. En el presente trabajo estos factores fueron evaluados con el propósito de obtener una óptima extracción y pre-concentración del analito por micro-extracción líquido-líquido dispersiva acoplada a demulsificación con solventes (SD-DLLME) seguida de HPLC para la determinación de 2,4-D en orina.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Tipo de Estudio: El estudio es de tipo analítico experimental.

Muestras biológicas: muestras de orina aisladas de voluntarios adultos (hombres y mujeres) sin exposición laboral al 2,4-D. Las muestras se colectaron en recipientes comerciales estériles. Se prepararon muestras enriquecidas con 2,4-D a distintos niveles de concentración.

Método: se utilizó un patrón de 2,4-D de pureza certificada (98%) obtenido de *Sigma Aldrich*.

Se emplearon los siguientes reactivos: metanol, acetonitrilo (ACN), 1-octanol, ácido acético, cloruro de sodio y ácido clorhídrico, agua calidad HPLC y tiras de pH.

Se empleó un Cromatógrafo Líquido *Waters* modelo 2690 con detector de foto-arreglo de diodos *Waters* 996 (PDA) y sistema automático de registro de datos. El análisis cromatográfico se realizó a temperatura ambiente con una columna *LichroCART*® 100 RP-18 (5 µm), (250 mm de largo x 4 mm de diámetro interno) y guarda columna *LiChrospher*®100 RP-18 (5 µm) (*Merck*). El volumen de inyección fue de 40 µL. Se utilizó un gradiente de una solución acuosa de ácido acético al 1 % (A) y acetonitrilo (ACN) acidificado (1% con ácido acético) (B), como fase móvil. Se realizó un barrido espectral entre 210-400 nm y se cuantificó a 282 nm.

La extracción y pre-concentración del 2,4-D se realizó por microextracción líquido-líquido dispersiva acoplada a demulsificación con solvente en las condiciones propuestas por Behbahani M. y colaboradores (9). Esta técnica permite la simultánea extracción y concentración del analito a través del uso de un sistema ternario de solventes constituido por la fase acuosa (muestra de orina) y una mezcla de dos disolventes orgánicos; uno miscible con la fase acuosa y que funciona como agente dispersante/demulsificante (ACN) y otro inmisible con la fase acuosa llamado agente extractante (1-octanol). Cuando la mezcla dispersante/extractante se pone en contacto con la fase acuosa, se observa la formación de una emulsión, que incrementa al máximo la superficie de contacto entre las fases, favoreciendo así la rápida transición del analito entre la muestra y el extractante. Posteriormente se procede a agregar el solvente demulsificante que promueve la separación de las fases formándose una gota del agente extractante que contiene el analito.

## RESULTADOS

Se seleccionaron condiciones cromatográficas capaces de separar adecuadamente el 2,4-D de cualquier interferente presente en la matriz, con un gradiente de fase móvil de: 0 a 2 min: 57/43 (A/B); 5 a 25 min: 70/30 (A/B); 30 min: 57/43 (A/B). Utilizando el procedimiento propuesto por Behbahani y col. (9) se evaluó el efecto de la temperatura y la centrifugación (5 min. a 4000 rpm) en el proceso emulsificación/demulsificación. El procedimiento se aplicó a una muestra enriquecida con 2,4-D en las siguientes condiciones: temperatura ambiente: 25-27 °C y temperaturas controladas: 22°C, 20°C y 18°C. A temperatura ambiente, 20°C y 22 °C la formación de la gota fue incompleta y no se logró separar las fases aún después de centrifugar. A 18 °C y con centrifugación se obtuvo una separación de fases completa y una gota definida lo que permitió tomar un volumen mayor del solvente extractante para ser inyectado en el HPLC-PDA.

Una vez definidos los parámetros que mejoraron la formación de la gota, se procedió a optimizar aquellos que afectan a la sensibilidad del método. Se utilizó una muestra enriquecida con 2,4-D a un nivel de 240 µg/L. El procedimiento propuesto por Behbahani y col. (9) modificado (18°C, centrifugado 5 min. a 4000 rpm) se aplicó a muestras con distinta relación orina/agua. En la Tabla 1 se presentan los resultados de % de Recuperación y Límite de Detección (LD) para volúmenes de muestra entre 2 y 10 mL de orina. Si bien con 10 mL de orina se obtiene una buena recuperación y un bajo límite de detección, se observó que con este volumen de muestra no se cumple la proporcionalidad entre volumen de muestra y porcentaje de recuperación que se observa en las otras pruebas, esto puede estar relacionado con el hecho de que la dispersión no es completa en todo el volumen de la muestra cuando se emplean 10 mL de orina. Por lo tanto, se seleccionó como volumen óptimo 7 mL de orina, con el que se obtiene un LD de 10 µg/L.

**Tabla 1. Porcentaje de Recuperación y Límites de detección para distintos volúmenes de muestra.**

Relación Orina/H <sub>2</sub> O	Altura	Recuperación (%)	LD (µg/L)
2/5	7883	99	24
4/3	11400	98	17
5/2	14250	109	14
7	20000	96	10
10	24500	90	8

Como la efectividad del proceso emulsificación/demulsificación en la muestra de orina depende del tipo y volumen de los solventes utilizados. Se probaron metanol, acetona y acetato de etilo como agentes dispersante/demulsificante en la proporción 750 µL/750 µL y 75 µL 1-octanol como extractante. Con metanol se observó la formación de una gota pequeña aún después de centrifugar; con acetato de etilo y acetona no se logró la formación de la gota. Tampoco se obtuvieron buenos resultados en las pruebas con 75 µL de tolueno y 75 µL de hexano como solvente extractante. Las mejoras en el procedimiento no fueron consistentes empleando diferentes volúmenes de dispersante/demulsificante y extractante; se probaron: 500 µL /500 µL y 1000 µL /1000 µL de ACN; 50 µL y 100 µL de 1-octanol.

A partir de las pruebas realizadas que permitieron obtener las condiciones óptimas para extraer y pre-concentrar el analito en nuestro laboratorio el procedimiento quedó definido de la siguiente manera: (1) a temperatura ambiental controlada de 18 °C en un tubo de vidrio de 10 mL pesar 0,35 gramos de NaCl; (2) tomar 7 mL de orina sin diluir; (3) adicionar 70 µL de HCl concentrado (pH= 1 - 2); (4) agregar una mezcla de 750 µL de ACN (agente dispersante) y 75 µL de 1-octanol (agente extractante); (5) inmediatamente agregar 750 µL de ACN (agente

demulsificante); (6) centrifugar durante 5 min. a 4000 rpm; (7) tomar la fase orgánica (gota) y  
inyectar en el HPLC-PDA.

En la Figura I se presenta el esquema del procedimiento definitivo de extracción y pre-  
concentración.

**Figura I. Esquema del procedimiento de micro-extracción líquido-líquido dispersiva acoplada a demulsificación con solventes (SD-DLLME).**



## DISCUSIÓN

Al tratar de reproducir la metodología propuesta por Behbahani y col (9) en nuestro laboratorio encontramos que en las condiciones establecidas por los autores no obteníamos los mismos resultados. Por ello, se procedió a poner a punto parámetros que nos permitieran en primer lugar lograr la formación de la gota y en segundo obtener la mejor sensibilidad posible en nuestras condiciones de trabajo. Los parámetros seleccionados permitieron formar la gota y recuperar un volumen adecuado de extractante para ser inyectado en el sistema



cromatográfico. El límite de detección alcanzado (10 µg/L) para la determinación del 2,4-D en orina es apto para detectar los niveles esperados en la exposición laboral. Burns y Swaen (3) reportan para trabajadores, valores promedio comprendidos entre 5 y 45 µg/L con valores máximos entre 410 y 2500 µg/L. La metodología de extracción y pre-concentración demostró ser simple, rápida, económica y amigable con el ambiente. La metodología puesta a punto en este trabajo, una vez validada, permitirá contar con una herramienta para evaluar la exposición laboral a 2,4-D en una provincia como Córdoba en la que se utiliza ampliamente dicho herbicida.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- 1- Ruiz de Arcaute C, Soloneski S, Larramendy ML. Toxic and genotoxic effects of the 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4 -D) based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon Decemmaculatus*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2016; 128: 222–9.
- 2- Hines CJ, Deddens JA, Striley CAF, Biagini RE, Shoemaker DA, Brown KK, Mackenze BA, Hull RD. Biological Monitoring for Selected Herbicide Biomarkers in the Urine of Exposed Custom Applicators: Application of Mixed-effect Models. *Ann Occup Hyg* 2003; 47: 503-17.
- 3- Burns CJ, Swaen GMH. Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) biomonitoring and epidemiolog *Cr Rev Toxicol* 2012; 42: 768–86.
- 4- Vela-Soria F, Ballesteros O, Zafra-Gómez A, Ballesteros L, Navalón A. A multiclass method for the analysis of endocrine disrupting chemicals in human urine samples. Sample treatment by dispersive liquid-liquid microextraction. *Talanta* 2014; 129: 209–18.
- 5- Ranz A, Lankmayr E. Screening and optimization of the derivatization of polar herbicides with trimethylanilinium hydroxide for GC-MS analysis. *J Biochem Bioph Meth* 2006; 69:3-14.

- 6- Aprea C, Sciarra G, Bozzi N. Analytical Methods for the Determination of Urinary 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid and 2-Methyl-4-Chlorophenoxyacetic Acid in Occupationally Exposed Subjects and in the General Population. *J Anal Toxicol* 1997; 2:262-6.
- 7- Zang X, Wu Q, Zhang M, Xi G, Wang Z. Developments of dispersive liquid-liquid microextraction. *Chin J Anal.Chem* 2009; 37:161-8.
- 8- Rezaee M, Assadi Y, Milani M, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *J Chromatogr A* 2006;1116: 1-9.
- 9- Behbahani M, Najafi F, Bagheri S, Bojdi MK, Hassanlou PG, Bagheri A. Coupling of solvent-based de-emulsification dispersive liquid-liquid microextraction with high performance liquid chromatography for simultaneous simple and rapid trace monitoring of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid. *Environ Monit Assess* 2014; 186:2609-18.