

ANÁLISIS DE PRESENCIA DE COMPUESTOS QUÍMICOS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS EN DESECHOS PECUARIOS UTILIZADOS COMO ENMIENDAS ORGÁNICAS EN LA PROVINCIA DE SANTA FE

Aymerich, Candela¹

¹ Laboratorio de Desarrollo Analítico y Quimiometría, Cátedra de Química Analítica I, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas – UNL

Directora: Alcaraz, Mirta

Co-Directora: Montemurro, Milagros

Área: Ciencias Naturales

Palabras claves: Enmiendas, quimiometría, fármacos

INTRODUCCIÓN

La provincia de Santa Fe es una de las principales áreas productoras de granos del país destinando casi un 36 %* de su territorio a la explotación agrícola. Asimismo, cuenta con 2701* granjas pecuarias (porcinas y avícolas) de engorde y producción (*según Censo Nacional Agropecuario, INDEC 2018). Si bien la concentración e intensificación de cultivos y animales son la clave para el éxito económico del sector agropecuario, resulta ineludible la necesidad de una concientización por parte de los productores acerca del potencial impacto ambiental que podrían ocasionar los procesos y variables asociados a estas prácticas. El uso de fitosanitarios para el control de plagas y de fertilizantes minerales debido a la deficiencia nutricional de los suelos son las principales causas de desestabilización medioambiental de la producción agrícola. La producción pecuaria enfrenta su mayor desafío en el control y gestión de los residuos generados debido al riesgo biológico y químico que representan para el ecosistema. Actualmente, se evalúa la posibilidad de utilizar los efluentes pecuarios como enmiendas orgánicas en pos de un beneficio bilateral entre ambas actividades: *la reutilización de residuos pecuarios para el mejoramiento de suelos y la nutrición vegetal en los cultivos.*

Título del Proyecto: Desarrollo de estrategias analíticas basadas en el modelado quimiométrico de datos multidimensionales para el análisis de muestras biológicas, alimenticias y ambientales

Instrumento: CAI+D

Año convocatoria: 2020

Organismo financiador: UNL

Directora: Culzoni, Maria Julia

Los análisis de rutina realizados en enmiendas orgánicas se basan en la determinación de nutrientes y parámetros de calidad y patogenicidad. Sin embargo, Es de destacar que, aunque esta práctica resulte una alternativa prometedora y de alto valor agronómico para el sector agropecuario, se desestima el potencial impacto negativo en el ecosistema que pudiesen ocasionar los compuestos químicos biológicamente activos (CQBA) que entran en el efluente por el uso en la prevención y el control de plagas y enfermedades. Con respecto a las enmiendas orgánicas, las reglamentaciones nacionales vigentes carecen de especificaciones concretas en referencia a parámetros de inocuidad ambiental, como límites máximos de residuos (LMR) de CQBA. Por ello es necesario realizar investigaciones integrales de ocurrencia de CQBA como medida de prevención para evitar su inserción al medio ambiente.

En este trabajo se presenta el desarrollo y optimización de una plataforma analítica-quimiométrica basada en cromatografía líquida de alto rendimiento para la determinación de 12 CQBA en enmiendas orgánicas. Estos compuestos fueron seleccionados considerando la distribución y el uso en granjas de la provincia y por ser los que presentan actividad biológica activa sobre microorganismos y organismos vivos siendo los seleccionados, los más representativos de cada familia química.

OBJETIVOS

Desarrollar y optimizar una plataforma analítica basada en cromatografía líquida de alto rendimiento para la determinación de compuestos químicos biológicamente activos en enmiendas orgánicas basadas en compost de purines de cerdo en soporte vegetal.

METODOLOGÍA

Método cromatográfico. Todos los experimentos se llevaron a cabo usando un instrumento Agilent 1260 LC Infinity (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) equipado con desgasificador, bomba binaria, inyector automático, compartimento termostatzado para columna, detector de arreglo de diodos (DAD) UV-Vis y detector de fluorescencia de barrido rápido (FSFD) y el programa informático ChemStation (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) requerido para el control del instrumento y la adquisición de los datos. La separación cromatográfica se realizó utilizando una columna analítica columna Zorbax *SB-Aq* 4.6x100 mm 3.5 μ m (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) como fase estacionaria, operando en modo gradiente con una velocidad de flujo de 1.50 mL min⁻¹, con una temperatura de compartimento para columna de 35 °C, durante 20.0 min. El gradiente de elución optimizado para la separación cromatográfica se muestra en la Tabla 1.



Tiempo (min)	PBP (%)	ACN (%)
0	90	10
1.5	90	10
12	40	60
13	40	60
15	90	10

Tabla 1: Gradiente de fase móvil implementado para el análisis. PBP: Buffer fosfato de potasio 10 mmol L⁻¹, pH 3.0

Muestras de calibración y validación. Para construir las mezclas de calibración, los analitos se dividieron en 3 bloques de acuerdo al tipo de compuesto, tiempo de retención (teniendo en cuenta aquellos compuestos que no presentaron resolución cromatográfica completa) y detección. De esta manera, los bloques de calibración quedaron compuestos de la siguiente manera: 1) Ofloxacina (OFL), Ciprofloxacina (CPF), Enrofloxacina (ENF) y Toltrazuril (TZL); 2) Oxitetraciclina (OTC), Clortetraciclina (CTC), Florfenicol (FFC) y Fenbendazol (FBZ); 3) Tilosina (TYL), Ceftiofur (CFT), Sulfametoxazol (SMX) y Sulfaquinoxalina (SQX). Las mezclas de calibración se prepararon en 5 niveles de concentración para cada analito, por triplicado, de manera aleatorizadas obteniéndose un total de 16 mezclas por bloque.

Para la validación, se preparó un set de 15 soluciones mezcla que contenían los 12 analitos en distintas concentraciones, considerando valores distintos a los utilizados para la calibración. Las mezclas se construyeron en 3 niveles de concentración, siguiendo un modelo aleatorio.

Todas las soluciones fueron preparadas por transferencia de alícuotas apropiadas de cada solución madre de los analitos correspondientes a matraces aforados de 2 ml. Completándose el volumen con una mezcla de solvente optimizada compuesta de PBP, MeOH y ACN. Finalmente, previamente a la inyección al sistema cromatográfico, todas las soluciones se filtraron usando membranas de nylon con tamaño de poro de 0.45 µm y se transfirieron a viales de inyección de 2 mL. Seguidamente, se inyectó un volumen de 20 µL en el sistema cromatográfico.

Muestreo. Se realizó el muestreo en la línea de producción desde el inicio, sin agregado de efluentes, hasta el momento en el que se considera producto terminado. Se obtuvieron muestras globales representativas del lote a analizar, teniendo especial cuidado en las muestras que puedan presentar elevado grado de heterogeneidad. El muestreo se llevó a cabo según el procedimiento descrito en el Marco Normativo para la Producción, Registro y Aplicación de Compost de la Resolución Conjunta 1/2019 (e.10/01/2019 N° 1244/19 v. 10/01/2019). Considerando que el procedimiento está descrito para el muestreo en producto final de compost, se implementó el mismo procedimiento para el muestreo durante la línea de producción del compost.

Las muestras de compost se obtuvieron de una granja de cría de cerdos y se almacenaron a -4°C al resguardo de la luz, hasta su análisis. Una porción de aprox. 100g de muestra se descongeló y secó en estufa a 37°C para evitar los efectos de la variabilidad de humedad. Posteriormente, se dejó estabilizar a temperatura ambiente y se tomó una masa de 5 g,

perfectamente pesada, que se transfirió en un erlenmeyer de 50 mL. Se prepararon 2 set de muestras incluyendo la muestra sin fortificar y fortificada.

CONCLUSIONES

Se desarrolló un método cromatográfico acoplado a calibración multivariada de segundo orden que permitió la determinación simultánea de 12 compuestos químicos biológicamente activos. Los resultados obtenidos quimiométricamente demostraron la factibilidad del método para la determinación de CQBA, presentándose como una herramienta eficiente para el análisis de inocuidad ambiental de materiales utilizados como enmiendas orgánicas. El sistema analítico estudiado se presenta como un sistema complejo, cuya complejidad radica principalmente en el solapamiento de las señales cromatográficas, la similitud de los espectros de absorbancia y fluorescencia y la presencia de potenciales interferentes que puedan estar presentes en muestras de composición desconocida. (Ver Figura 1)

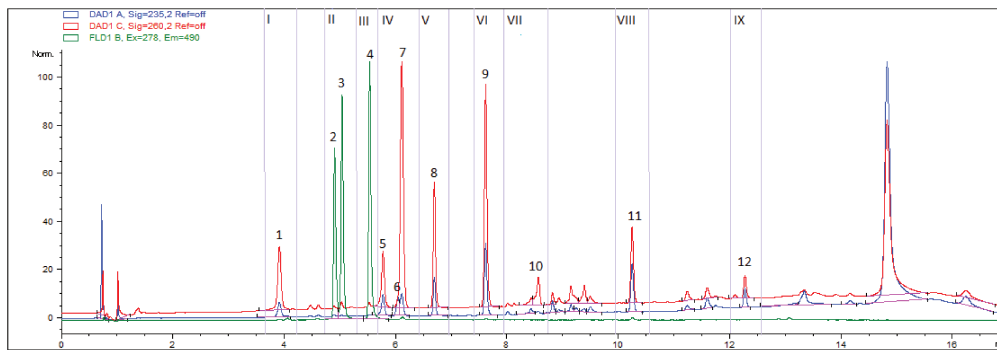


Figura 1. Cromatograma obtenido para una muestra de validación conteniendo los 12 CQBA ($\lambda = 235$ nm (azul), $\lambda = 260$ nm (rojo) y fluorescencia $\lambda_{ex-em} = 278 - 490$ (verde)). Región I: OTC (1); región II: OFL (2), CPF (3); región III: ENF (4); región IV: CTC (5), FFC (6) y SMX (7); región V: CFT (8); región VI: SQX (9); región VII: TYL (10); región VIII: FBZ (11) y región IX: TZL (12).

A futuro se prevé finalizar con el diseño y optimización de la extracción de los CQBA de las muestras y así poder analizar la presencia y prevalencia en las muestras de compost a distintos períodos del proceso de compostaje que permitirán evaluar una de las aristas que se propone para garantizar la inocuidad sanitaria del producto compostado.

REFERENCIAS

1. **Gorska, M., Greda, K., & Pohl, P.** (2021). Determination of bismuth by optical emission spectrometry with liquid anode/cathode atmospheric pressure glow discharge. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 36(1), 165-177.
2. **Flandroy, L.; Poutahidis, T.; Berg, G.; Clarke, G.; Dao, M.-C.; Decaestecker, E.; Furman, E.; Haahtela, T.; Massart, S.; Plovier, H.; Sanz, Y.; Rook, G.** (2018). The impact of human activities and lifestyles on the interlinked microbiota and health of humans and of ecosystems. *Sci. Total Environ.*, 627, 1018-103