

# DEGRADACIÓN HIDROLÍTICA DE CLORPIRIFOS Y EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DEL EXTRACTO HIDROLIZADO CON *Daphnia pulex*

Jhon Fredy Narváez Valderrama<sup>1</sup>, Julián Andrés Berrio Puerta<sup>2</sup>, Sara Correa Zuluaga<sup>3</sup>,  
Jaime Alberto Palacio Baena<sup>4</sup>, Francisco José Molina Pérez<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Químico Farmacéutico, Estudiante de doctorado en Ingeniería, jfqumifarmudea@gmail.com

<sup>2</sup>Estudiante de química farmacéutica, jul3342@hotmail.com

<sup>3</sup>Ingeniera sanitaria, Estudiante de maestría en Ingeniería ambiental, sharis\_3@yahoo.com

<sup>4</sup>Biólogo, Doctor en recursos naturales, jpalaciob@gmail.com

<sup>5</sup>Doctor en Ingeniería Química y Ambiental, Docente de la Facultad de Ingeniería, fmolina@udea.edu.co  
Grupo de investigación en Gestión y Modelación Ambiental-GAIA, Universidad de Antioquia, calle 62 N° 52-59 Medellín-Colombia.

## RESUMEN

El clorpirifos (CPF) es un plaguicida organofosforado de amplio uso en Colombia. Bajo condiciones hidrolíticas puede transformarse en 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol (TCP), del cual se desconoce su impacto ambiental. En este trabajo, se evaluó la degradación hidrolítica del CPF y la toxicidad de una muestra única sobre *Daphnia pulex* luego de un proceso de 24 horas de degradación. La concentración de CPF se determinó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Las vidas medias encontradas para CPF fueron de 18.52, 49.79 y 12.45 horas a condiciones de pH 5.74, 7.83 y 9.46 respectivamente. Los ensayos de toxicidad, mostraron la inmovilidad de la totalidad de los neonatos de *D. pulex* expuestos a la muestra degradada. Estos resultados indican que bajo pH similares a los evaluados, el CPF es transformado a TCP y que los productos de degradación pueden incrementar los efectos tóxicos del CPF en el ambiente.

**Palabras clave:** Clorpirifos, Hidrólisis, Persistencia, Productos de degradación, Toxicidad, Tiempo de vida media, *Daphnia pulex*.

Recibido: 10 de Abril de 2014. Aceptado: 30 de Junio de 2014

Received: April 10<sup>th</sup>, 2014. Accepted: June 30<sup>th</sup>, 2014

## HYDROLYTIC DEGRADATION OF CHLORPYRIFOS AND ASSESMENT OF HYDROLYZED EXTRACT USING *Daphnia pulex*

### ABSTRACT

*Chlorpyrifos (CPF) is an organophosphorus pesticide widely used in Colombia. Under hydrolytic conditions CPF may be transformed to 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) which environmental impact is still unknown. In this work, the hydrolytic degradation of CPF was studied as well as the toxicity of a single sample for exposition of Daphnia pulex after 24 hours of sample degradation. The CPF concentration was determined by Gas chromatography- mass spectrometry (GC/MS). The half-life found for CPF was 18.52, 49.79 and 12.45 hours, for pH values of 5.74, 7.83 and 9.46, respectively. The toxicity assay showed immobility of all D. pulex neonates exposed to the sample. These results indicate that under similar condition of pH, the CPF is transformed to TCP. Also, the degradates may increase the complexity of toxicity effects of CPF in the environment.*

**Keywords:** Chlorpyrifos, Hydrolysis, Persistence, Degradates, Toxicity, Half-life, *Daphnia pulex*.

## 1. INTRODUCCIÓN

En Colombia la venta de plaguicidas en el año 2012 ascendió a 11.820 ton, de las cuales 1.360 correspondieron a Clorpirifos (CPF), un plaguicida organofosforado que representa un riesgo potencial [1-3]. Se estima que del total de plaguicida aplicado en zonas agrícolas, más del 90% del ingrediente activo y sus productos de degradación pueden ingresar a los ambientes acuáticos debido a prácticas inadecuadas de aplicación [4]. La degradación de plaguicidas en el agua ocurre a través de procesos abióticos (hidrólisis y fotólisis) y bióticos (degradación microbiana) y entre estos, la hidrólisis es muy importante [5-7]. Generalmente, la hidrólisis de los plaguicidas organofosforados implica la ruptura de ésteres fosfóricos o tiofosfóricos mediante ataques nucleofílicos o electrofílicos, dando lugar a la degradación primaria de estas sustancias [8]. Estas reacciones dependen del pH del agua.

Un estudio realizado en 1996, reportó que en las zonas aledañas al embalse Riogrande II, se aplican frecuentemente plaguicidas organofosforados incluyendo CPF en las actividades agrícolas [9]. De acuerdo con algunos estudios, esta sustancia posee una vida media entre 10 a 120 días en el agua y se transforma en 3,5,6-tricloro-2-pyridinol (TCP) bajo mecanismos hidrolíticos [10]. En consecuencia, el CPF y sus productos de transformación pueden contaminar el recurso hídrico en zonas con gran actividad agrícola y podría implicar una exposición de los seres humanos a este plaguicida y sus productos de degradación [11]. Sin embargo, los grandes volúmenes de dilución en cuerpos de agua, aumentan las dificultades analíticas para valorar la presencia de los productos de degradación y los plaguicidas [12-13].

El pH del agua es un factor determinante en los procesos de degradación hidrolítica de plaguicidas, lo cual disminuye su persistencia y por lo tanto su ecotoxicidad. Sin embargo, algunos productos de transformación pueden tener una mayor capacidad de bioacumulación y ser más tóxicos que los plaguicidas [14]. Debido a la importancia de la degradación hidrolítica en el comportamiento de los plaguicidas en la fase ambiental, se realizaron ensayos de hidrólisis de CPF bajo condiciones controladas. Los pH evaluados corresponden a valores encontrados en embalses colombianos, con el fin de determinar si estas condiciones

ambientales favorecen la formación de TCP y si esta transformación puede aumentar el riesgo en cuerpos de agua. Estos resultados, podrían sugerir la evaluación de este producto de degradación en los parámetros de calidad de agua.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Materiales

Los estándares de alta pureza (>99.5%) para CPF y TCP fueron adquiridos en Chemservice. Los solventes de alta pureza (Para análisis de residuos de plaguicidas y cromatografía de gases) Metanol (MeOH), acetona, acetonitrilo (ACN) y acetato de etilo (EtOAc) fueron suplidos por Burdick and Jackson (Honeywell). El MTBSTFA- CAS no. 77377-52-7 fue suministrado por Sigma Aldrich. El sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), Acetato de Sodio ( $\text{CH}_3\text{COO-Na}$ ) y el cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) fueron suministrados por CARLO ERBA. Los cartuchos para SPE Bond-Elut/ 3mL, fueron comprados en Agilent technologies. Finalmente la columna para GC/MS Rtx-5silMS 30m-0.25  $\mu\text{m}$ -0.25mmID fue suplida por Restek.

### 2.2. Hidrólisis de CPF

Para la hidrólisis de CPF a pH 5.74, 7.83 y 9.46 se emplearon tres replicas por tratamiento y siete tiempos de reacción (0, 6, 12, 16 24, 60 y 90 horas), agitación constante y un control negativo. Para controlar el pH de los tratamientos durante el estudio cinético, se prepararon 2 soluciones buffer con agua desionizada: una solución ácida ( $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ ) y otra básica ( $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ ) con pH de 5.74 y 9.46 respectivamente. Para las muestras de pH neutro, se usó agua desionizada con un pH de 7.83. Posteriormente, a cada muestra se le adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de una solución patrón de CPF a una concentración inicial de 1100 ppb en metanol.

### 2.3. Análisis de CPF y TCP por GC/MS

Para el tratamiento de muestra, se tomaron 10 mL de agua y se realizó una extracción en fase sólida con cartuchos SPE-bond elut, previamente acondicionados con HCl 0.1M:  $\text{H}_2\text{O}$ : MeOH en proporción 2:2:2. Posteriormente, se eluyeron los analitos con una mezcla de EtOAc: Acetona: ACN en proporción 5:15:10. El eluido se recolectó en un balón de vidrio y las muestras se evaporaron a sequedad con ayuda de un rotaevaporador. Finalmente, el extracto concentrado se reconstituyó con 1 mL de EtOAc: Acetona en proporción 1:1 y se

llevó a un vial de cromatografía. Para la cuantificación de CPF se empleó una metodología analítica modificada del trabajo de investigación de Holger y colaboradores, la cual fue modificada y previamente validada en el laboratorio [15]. Se inyectó 1 µL de la muestra en un equipo GC/MS marca Thermo Scientific con ionización por impacto electrónico (EI) y detector de simple cuadrupolo en modo SIM y en modo SCAN bajo las siguientes condiciones: Temperatura inicial 50°C, se incrementó la temperatura a una tasa de 25°C por minuto hasta 320°C y allí se mantuvo por 1 minuto. Se usó gas Helio como gas de arrastre y una columna Restek para la separación, los compuestos fueron identificados en cada muestra por medio de espectrometría de masas usando la librería NIST MS. Para la cuantificación de TCP se adicionaron 100 µL de la fracción reconstituida en insertos de vidrio y se mezclaron con 20 µL del derivatizante metil-tributil-silil-trifluoro acetamida (MTBSTFA). Posteriormente, las muestras se sometieron a derivatización durante 1 hora a 70°C. Las muestras derivatizadas son estables por un mes [16]. Finalmente, se inyectó 1µL de la fracción derivatizada en el GC/MS bajo las mismas condiciones descritas para CPF.

### Ensayos de toxicidad con *D. pulex*

Para la evaluación de la toxicidad aguda del extracto hidrolizado con *D. pulex*, se aplicó el método analítico de la EPA del 2002 [17]. La Cepa de *D. pulex* fue cultivada bajo las siguientes condiciones: temperatura 22 ± 1°C con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad e iluminación con 1000 a 1500 lux. La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo en un nivel superior al 60% de saturación. Diariamente se suministraron a los cultivos 4.5 ml/L del alimento (tetramin y alfalfa). Finalmente, en el ensayo de toxicidad con muestra única, se realizaron 4 réplicas con 10 individuos neonatos de 24 horas de edad expuestos durante 48 horas al extracto hidrolizado.

### Análisis de los datos

Se aplicó un diseño de experimentos factorial con 2 factores (factor 1 tiempo de hidrolisis factor 2 pH) con 10 tratamientos y 3 réplicas.

Para el análisis de los resultados se emplearon pruebas no paramétricas: análisis de varianza multifactorial (ANOVA), Kruskal-Wallis y diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher; Aceptando un valor de significancia estadística del 95%.

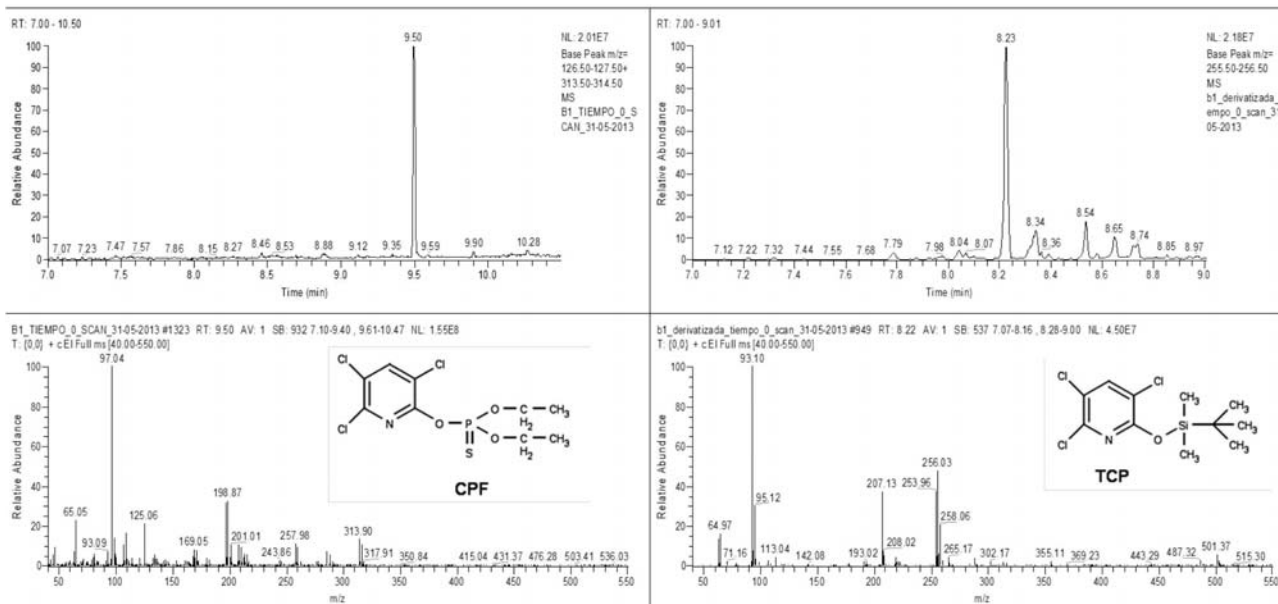


Fig 1. Corrido cromatográfico (GC/MS full SCAN) para CPF y TCP. Los resultados corresponden al tiempo cero para la hidrolisis básica del CPF. La identificación por espectrometría de masas demuestra la presencia de los analitos de interés en las muestras tratadas

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Determinación de CPF y TCP en muestras hidrolizadas por GC/MS.

Los compuestos CPF y TCP fueron cuantificados usando un ion específico y un ion de confirmación en modo SIM (tabla 1).

Tabla 1. Tiempo de retención ( $t_R$ ), ion de cuantificación (IQ) y un ion de detección (ID) de compuestos identificados en las muestras hidrolizadas

Compuesto	$t_R$ (min)	IQ	ID
CPF	9.50	314	197
TCP	8.23	254	256

Los corridos cromatográficos presentados en la Figura 1, indican una buena separación de los analitos de interés en full SCAN.

Los resultados en modo SCAN que se muestran en la figura 1, muestran la presencia de TCP en las muestras hidrolizadas a pH básico, sin embargo se encontró la presencia de este metabolito en los diferentes tratamientos, lo que indica la degradación primaria del CPF por medio de mecanismos hidrolíticos.

De acuerdo con algunos autores, durante la degradación primaria se produce una transformación que altera la estructura molecular de las sustancias químicas [18]. En los plaguicidas organofosforados, se ha reportado hidrólisis en medios acuosos ácidos, básicos y neutros por ataques electrofílicos y nucleofílicos, siendo la hidrólisis básica la vía predominante [19].

Para el CPF, ha sido propuesto un mecanismo de ruptura homolítica del enlace fosfoester del plaguicida (Fig. 2).

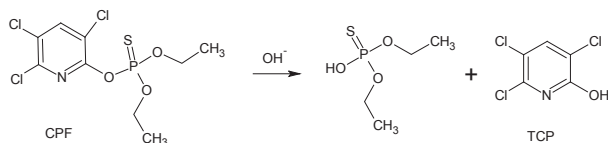


Fig 2. Ruptura homolítica del CPF y formación del metabolito TCP. Tomado de Hydrolysis of chlorpyrifos in natural waters of the Chesapeake Bay [8]

La reacción que se muestra en la figura 2, indica los mecanismos bajo los cuales pudo transformarse el TCP en las muestras sometidas a hidrólisis química.

En la figura 2 se observa, como un rompimiento del enlace oxígeno-fósforo, bajo condiciones hidrolíticas, lleva a la formación del TCP.

#### 3.2. Influencia del pH en la tasa de degradación

Al comparar los valores medios de CFP en los tres tratamientos mediante el método de la diferencia significativa mínima (LSD) de Fisher, se evidenciaron diferencias estadísticamente importantes y en consecuencia, es evidente que la tasa de degradación hidrolítica del CPF en el agua está afectada por el pH del medio. Además, como se infiere en las Fig 3. A, B y C, la transformación del CPF presenta un decaimiento de tipo exponencial.

De acuerdo con el análisis gráfico de las figuras A, B y C, la transformación hidrolítica del CPF presentó una cinética de primer orden, tal como ha sido reportado por otros autores [20].

En todos los procesos hidrolíticos se encontró el metabolito TCP en modo SCAN y se determinó de forma cualitativa la presencia de dicho compuesto (Fig.1), de esta forma, la identificación de TCP en las muestras, indica un rompimiento del enlace fosfoester del CPF de forma similar a la propuesta por algunos autores.

Los resultados de vida media indican la degradación del 50% del CPF en menos de 50 horas en los tres tratamientos, lo que muestra una baja estabilidad del ingrediente activo en soluciones acuosas aún en condiciones neutras, como se muestra en la tabla 3.

Como se observa en la tabla 3 la vida media de CPF varió entre 12.45 en el tratamiento con un pH de 9.46 y 49.79 horas en la solución neutra (pH=7.83). En la solución ácida (pH=5.74) la vida media del CPF fue 18.52 horas.

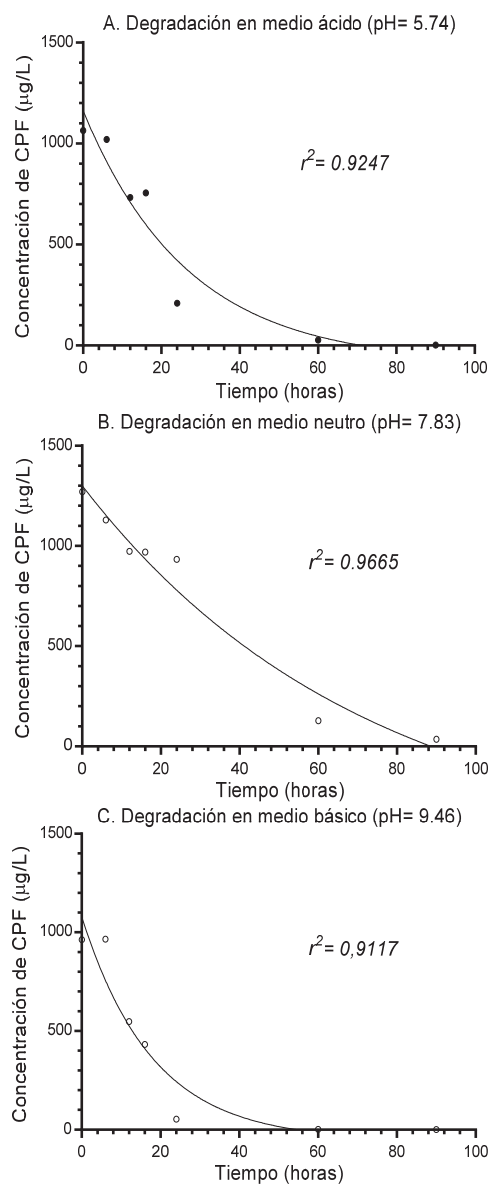


Fig 3. Transformación hidrolítica de CPF bajo condiciones ácidas (A), básicas (B) y neutras (C). Los coeficientes de correlación indican un buen ajuste del modelo de regresión para el decaimiento de primer orden

Tabla 3. Vida media del CPF en los tres tratamientos

	pH		
Tratamiento	5.74	9.46	7.83
Vida media (h)	18.52	12.45	49.79

Los valores reportados en la tabla 3, son inferiores a los reportados en la literatura, los cuales oscilan entre 10 a 120 días en el agua [8]. En dicho trabajo se evaluó los efectos hidrolíticos del CPF en agua natural y por tanto, los altos valores de vida media del CPF podrían atribuirse al efecto complejante de la materia orgánica u otras sustancias presentes en la matriz y que pueden alterar la cinética de degradación y el tiempo de vida media [9]. Dado que en esta investigación se realizaron los ensayos hidrolíticos en agua desionizada, las diferencias en la vida media del CPF se pueden asociar al pH del agua.

### 3.3. Implicación de los resultados encontrados en las prácticas agrícolas.

En las prácticas agrícolas, los agricultores aplican el CPF (polvo) en solución acuosa. De acuerdo con los resultados de vida media, es importante que los agricultores no almacenen soluciones del CPF antes de su aplicación, debido a que una fracción importante de esta sustancia puede transformarse hasta TCP. Además, es posible que la hidrólisis química del CPF en las soluciones de aspersión modifique el efecto de este insecticida durante el control de plagas en las fumigaciones.

Los resultados de este trabajo indican la conveniencia de aplicar rápidamente el CPF después de su preparación en agua, con el fin de mejorar su eficacia. Además, para los agricultores una disminución del poder insecticida del CPF genera una aplicación de concentraciones mayores del producto o el empleo de otros plaguicidas. Además, la degradación del CPF en la solución de aplicación, representa una disminución en las dosis sugeridas por los proveedores y por lo tanto se podría favorecer la resistencia de plagas.

### 3.4. Análisis de la toxicidad de muestras hidrolizadas

La exposición de neonatos de *D. pulex* a la solución hidrolizada pH 9.46 (t=24 horas), produjo inmovilidad de todos los ejemplares. Estos resultados indican una alta toxicidad del extracto, incluso después de una degradación del 90% del

CPF, lo que indica que los sub-productos de degradación del CPF son tóxicos para los neonatos. Dado que la hidrólisis del CPF a TCP produce una pérdida de la actividad insecticida de la solución, es posible que los efectos sobre *D. pulex* estén asociados a la acción del TCP y otros metabolitos no considerados en la investigación. Estos resultados indican que en los estudios sobre las implicaciones de este tipo de sustancias en los ecosistemas acuáticos, es importante considerar el análisis del CPF junto con los metabolitos más importantes.

### 3.5. Implicación de los resultados encontrados en el estudio de la dinámica del CPF en el agua.

En los cuerpos de agua con pH similares a los evaluados, el ingreso de CPF por infiltración o escorrentía lleva a una degradación hidrolítica de este plaguicida a TCP, un metabolito del cual no se posee información relacionada con su toxicidad. Por lo tanto, para los cuerpos de agua destinados para la captación de agua en acueductos, se sugiere el análisis del CPF junto con su producto de degradación, con el fin de realizar una mejor valoración de la calidad de agua por contaminación con esta sustancia.

## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Aunque en todos los tratamientos, el CPF se transformó a TCP, el pH básico (9.46) favoreció una degradación más rápida y por tanto una vida media más corta.

Se evidenció una alta tasa de transformación del CPF a TCP en todos los tratamientos y en consecuencia, inestabilidad acuosa del CPF. Se sugiere que después de su preparación, el producto se aplique rápidamente con el fin de asegurar su eficacia. Además la degradación rápida del CPF a TCP muestra la importancia de incluir este producto de degradación en los análisis de calidad de agua.

Las muestras hidrolizadas de CPF en pH básico, producen la inmovilización de todos los neonatos de *D. pulex* indicando una alta toxicidad.

## 5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Elizabeth Gómez G por su soporte en los ensayos con *D. pulex* y a Diana Agudelo E. por la asesoría estadística en este proyecto. Esta investigación se realizó en el Grupo de Investigación en Gestión y Modelación Ambiental-GAIA de la Universidad de Antioquia y con la cofinanciación de Empresas Públicas de Medellín.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Instituto Colombiano Agropecuario. ICA subgerencia de protección vegetal. Estadísticas de comercialización de plaguicidas químicos de uso agrícola 2012 [Internet]. Boletín técnico Código: 00.02.96.13 [Consultado 2014 Jun 29; citado 2014 Jul 02]. Disponible en: <http://www.ica.gov.co/Trazabilidad/Comercializacion-plaguicidas-2012-%282%29.aspx>
- [2] Zhang, X., Shen, Y., Yu, X y Liu, X. Dissipation of chlorpyrifos and residue analysis in rice, soil and water under paddy field conditions, *Ecotoxicol Environ Saf.*, 78, 276-280, 2012.
- [3] Kim, H., Lim, Y., Yang, J., Shin, D., Ham, H., Choi, B., Lee, J. Health risk assessment of exposure to chlorpyrifos and dichlorvos in children at childcare facilities, *Sci Total Environ.*, 444, 441-450, 2013.
- [4] Wang, C.J., Liu, Z.Q. Foliar uptake of pesticides- Present status and future challenge. *Pesticide Biochemistry and Physiology.*, 87(1), 1-8, 2007.
- [5] Arias, M., López, E., Martínez, E., Simal, J., Mejuto, J., García, L. "The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture, Ecosystems & Environment.*, 123(4), 247-260, 2008.

- [6] Kumar, S., Mukerji, K.G y Lal, R. Molecular aspects of pesticide degradation by microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology.*, 22(1): 1-26, 1996.
- [7] Narváez, J.F., Palacio, J.A y Molina F.J. Persistencia de plaguicidas en el ambiente y su ecotoxicidad: Una revisión de los procesos de degradación natural, *Gestión y Ambiente.*, 15(3), 27-37, 2012.
- [8] Liu, B., McConnell, LL. y Torrents, A. Hydrolysis of chlorpyrifos in natural waters of the Chesapeake Bay, *Chemosphere.*, 44(6), 1315-23, 2001.
- [9] Londoño L. Uso y manejo de plaguicidas en la zona de influencia del embalse Río Grande II. Trabajo de grado para optar por el título de ingeniero agrónomo. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ciencias agropecuarias., Medellín 1996.
- [10] Macalady, D. y Wolfe, N. New perspectives on the hydrolytic degradation of the organophosphorothioate insecticide chlorpyrifos, *Journal of agricultural and food chemistry.*, 31(6), 1139-1147, 1983.
- [11] Banks, K.E., Hunter, D.H y Wachal, D.J. Chlorpyrifos in surface waters before and after a federally mandated ban, *Environment International.*, 31 (3), 351–356, 2005.
- [12] Nollet, L. M. L. y Rathore, H.S. *Handbook of pesticides: methods of pesticide residues analysis*, CRC, 2009.
- [13] Narváez, J.F, Molina, F.J. Los muestreadores pasivos: una nueva alternativa metodológica en el monitoreo de plaguicidas en ambientes acuáticos a niveles de sub-trazas, *Revista politécnica.*, 15, 53-62, 2012.
- [14] Belfroid, A.C., Van Drunen, M., Beek, M.A., Schrap, S.M., Van Gestel, C.A., Van Hattum, B. Relative risks of transformation products of pesticides for aquatic ecosystems, *The Science of the Total Environment.*, 222(3), 167-183, 1998.
- [15] Holger, M. K y Angerer, J. Analysis of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in urine samples from the general population using gas chromatography–mass spectrometry after steam distillation and solid-phase extraction, *Journal of Chromatography B.*, 759, 43–49, 2001.
- [16] Bartels, M.J y Kastl, P.E. Analysis of 3,5,6-trichloropyridinol in human urine using negative-ion chemical ionization gas chromatography—mass spectrometry, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.*, 575 (1), 69-74, 1992.
- [17] USEPA, Environmental Protection Agency, *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*, 2002.
- [18] Raymond, J.W., Rogers, T.N., Shonnard, D.R., y Kline, A.A. A review of structure-based biodegradation estimation methods, *Journal of Hazardous Materials.*, 84(2-3), 189-215, 2001.
- [19] Pehkonen, S.O y Zhang Q. The Degradation of Organophosphorus Pesticides in Natural Waters: A Critical Review, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology.*, 32(1), 17-72, 2002.
- [20] Lu, J., Wu, L., Newman, J., Faber, B y Gan J. Degradation of pesticides in nursery recycling pond waters, *Journal of agricultural and food chemistry.*, 54(7): 2658-2663, 2006.