

# VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS ORGANOCOLORADOS EN TEJIDO ADIPOSEO

## METHOD VALIDATION FOR ORGANOCHLORINE PESTICIDES ANALYSIS IN ADIPOSE TISSUE

Andrés Felipe Villadiego Arteaga<sup>1\*</sup>, Alejandro García Ríos<sup>1</sup>, Alberto Sánchez López<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>. Laboratorio de Plaguicidas y Salud. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad del Quindío

<sup>2</sup>. Grupo de Investigación en Físicoquímica ambiental y Computacional. Facultad de Ciencias Básicas y tecnologías. Universidad del Quindío.

Recibido: Agosto 10 de 2013

Aceptado: Agosto 19 de 2013

\*Correspondencia del autor. Laboratorio de Plaguicidas y Salud. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad del Quindío  
E-mail: andresf.villadiego@gmail.com

### RESUMEN

Los plaguicidas organoclorados (OCPs) presentan efectos tóxicos en humanos y animales, alta persistencia, bioacumulación y biomagnificación en tejidos lipídicos. El análisis de los OCPs en muestras grasas puede usarse como parámetro de evaluación del riesgo y factor de contaminación ambiental, pero este se dificulta por la complejidad de la matriz. Se evaluaron diferentes solventes en la extracción asistida por ultrasonido (UAE) y el *clean up* con cartuchos de florisil, C18 y sílice, para extraer (OCPs) de tejido adiposo. Los extractos obtenidos en cada caso se analizaron por cromatografía de gases con detector de microcaptura de electrones (GC- $\mu$ ECD). Se validó el método para el análisis multiresiduo de 20 plaguicidas organoclorados según los números analíticos de mérito. Se obtuvo límites de detección (LOD) por debajo de 0,58 ppb y límites de cuantificación (LOQ) entre 1,75-0,45. La recuperación promedio de los plaguicidas fue de 86,2%.

### ABSTRACT

The organochlorine pesticides (OCPs) have high toxicity in human and animals. They present bioaccumulation and biomagnification effects in adipose tissue, through de food chains. The analysis of OCP's in fatty samples can be used as an evaluation risk parameter of environmental pollution; however this analysis is not commonly included in routine monitoring programs due the complexity of the matrix. Different extraction solvent and clean up sorbent material such as C18, florisil and silica were evaluated for the extraction of OCP's from adipose tissue samples. The extracts obtained were analyzed by gas chromatography with micro-electron capture detector (GC- $\mu$ ECD). Ultrasonic Assisted Extraction (UAE) was validated for a multiresidues method of 20 organochlorine pesticides. The limits of detection (LOD) were below of 0,58 ppb and limits of quantification ranging from 1,75-0,45 ppb. The average recoveries of the validated method were 86,2% .

## INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas organoclorados (OCPs) son hidrocarburos aromáticos con átomos de cloro como sustituyentes mayoritarios. Se caracterizan por ser estables y persistentes. Son lipofílicos y se bioacumulan y biomagnifican a través de la cadena trófica. Tienen efectos adversos a la salud y fueron regulados por el tratado de Estocolmo en el año 2003 (1).

El análisis de OCPs en diferentes matrices, entre ellas tejido adiposo, se emplea como parámetro de medición de la calidad de alimentos, ambiente y salud de la población (2). La complejidad de las muestras y las características fisicoquímicas de estos analitos hacen que las técnicas tradicionalmente usadas sean tediosas y costosas; con bajos porcentajes de recuperación y/o poca reproducibilidad (3).

El desarrollo e implementación de métodos rápidos, sensibles y selectivos es muy importante en química instrumental. La extracción asistida por ultrasonido (UAE) es una técnica empleada con éxito en el análisis de OCPs en diferentes muestras. Se caracteriza por ser rápida y permitir extracciones sucesivas con poco solvente. En esta técnica la muestra se dispersa en el solvente y aumenta la superficie de contacto, lo cual facilita y mejora la extracción (2).

En el estudio se optimizó, bajo los principios de la química analítica verde (4), cada paso de la preparación de muestra de tejido adiposo, en pro de reducir los errores inherentes al análisis de 20 OCPs y se evaluó la extracción asistida por ultrasonido, el solvente empleado y algunas condiciones del *clean up*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### • Reactivos y estándares

Se empleó material de referencia certificado de los plaguicidas organoclorados, *Organochlorine pesticide mix AB#3* de 2000 µg/mL, suministrado por RESTEK. La mezcla está compuesta por: α-BHC, β-BHC, γ-BHC, δ-BHC, heptacloro, aldrin, heptacloro epóxido, α-clordano, γ-clordano, 4,4'-DDE, endosulfan I, dieldrin, endrin, 4,4'-DDD, endosulfan II, 4,4'-DDT, endrin aldehído, metoxicloro, endosulfan sulfato, endrin cetona. A partir del material de referencia, se preparó una solución de 20 ppm para enriquecer las muestras y para construir una curva de calibración con 6 niveles por triplicado, en el rango de 5-1000 ppb, en un cromato-

tógrafo de gases *Agilent Technologies* 6890N.

Los solventes, grado residuos de plaguicidas, fueron acetonitrilo (Merck), hexano y acetona (FisherScientific); los reactivos, sulfato de sodio anhidro (Carlo Erba), sílica gel 60 (0,063-0,200 mm; Merk) y florisil (60-100 Mesh; J.T. Baker).

### • Extracción asistida por ultrasonido

Se empleó tejido adiposo de aves de engorde adquiridas en el mercado local. El tejido fue homogenizado en un ultraturrax digital *IKA-T25* y enriquecido con solución patrón (50 µL). Se evaluó el uso de acetona, acetonitrilo y hexano como solventes de extracción. El solvente con mejor porcentaje de recuperación y mayor número de analitos extraídos fue usado junto con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para evaluar las demás condiciones de extracción. Se empleó un ultrasonido *Branson* 3510 con frecuencia 40 kHz y voltaje 120V para asistir la extracción con solvente. Con pruebas preliminares se estableció la clase de solvente y el número de extracciones sucesivas necesarias para obtener un mayor porcentaje de recuperación. Las condiciones del método se optimizaron con un diseño experimental (DoE) Box-Behnken de tres factores y tres niveles, con porcentaje de recuperación como variable respuesta y nivel de significancia 0,05. El diseño de experimentos se hizo empleando el paquete estadístico *Statgraphics plus* 5.1. En la Tabla 1 se muestran los factores y niveles establecidos mediante pruebas preliminares para el diseño.

**Tabla 1.** Factores y niveles incluidos en el diseño

FACTORES	NIVELES		
Tejido Adiposo (g)	1	2	3
Volumen del solvente (mL)	2	3	4
Tiempo de extracción (min)	5	10	15

### • Clean up

Los compuestos coextraídos en el proceso se separaron por precipitación de lípidos a bajas temperaturas (LTP), dejando el extracto en baño de hielo por 30 min. Luego, una alícuota de 2 mL del extracto se eluyó en una columna preparada con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y florisil, en *manifold* a presión reducida. Para activar la columna y eluir los extractos se usó acetonitrilo. La comparación de las columnas de sílica, y C18 para *clean up* se hizo con 2 mL de extracto (luego de la LTP). Para el acondicionamiento de las columnas se usó acetonitrilo.

- **Validación del método analítico**

Se empleó un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies* 6890N equipado con detector  $\mu$ ECD y FID, y puerto de inyección *split/splitless* en modo manual. Las temperaturas del puerto de inyección y detector fueron 250 y 300 °C, respectivamente.

Para la separación de los analitos se usó una columna capilar de sílice fundida, HP-5 de 30 m x 0.25  $\mu$ m (D.I.), con fase estacionaria de 5%-fenil metil(polisiloxano) de 320  $\mu$ m (df). El gas de arrastre fue nitrógeno (99.9995%, Praxar, S.A.), a una velocidad lineal de 27 cm s<sup>-1</sup> y flujo de 1,2 mL min<sup>-1</sup>. La temperatura del horno se programó de 140°C hasta 180°C (3 min) @ 6°C min<sup>-1</sup>, de 180°C hasta 200°C @ 2°C min<sup>-1</sup>, y de 200°C hasta 280°C (10 min) @ 11°C min<sup>-1</sup>. El tiempo de corrida cromatográfica para la resolución total de los analitos fue de 36,9 min.

La validación del método analítico se realizó con base en el cálculo y medición de los siguientes parámetros: linealidad evaluada como el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de la curva de calibración, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ), calculados en ambos casos como 3,3 y 10 veces la desviación estándar de la pendiente (SD) sobre la pendiente, respectivamente. La repetitividad y la reproducibilidad se evaluaron con el coeficiente de variación (%C.V) de tres concentraciones inyectadas por triplicado. La exactitud del método se estableció con base al porcentaje de recuperación (% Rec) de los analitos. La cuantificación de los plaguicidas se realizó por el método de estándar externo usando el área bajo el pico cromatográfico.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- **Validación del método analítico**

Se validó el método para analizar residuos de los 20 OCPs en tejido adiposo. Se aseguró la confiabilidad de los resultados por medio de los números analíticos de mérito. En la Tabla 2 se muestran algunos números de mérito definidos en el método multiresiduo validado para cada analito.

En el rango de concentración evaluado (5-1000 ppb) el método fue lineal para todos los OCPs, 19 de ellos con  $R^2 \geq 0,998$ , excepto para el  $\gamma$ -BHC con  $R^2 = 0,978$ . Se determinó la repetitividad a nivel bajo, medio y alto de la curva de calibración para todos los plaguicidas. La precisión establecida como %CV de las áreas cromatográficas y los tiempos de retención de los 20 OCPs en los niveles evaluados no excedió el 10% y 2%, respectivamente. Esto es congruente con las guías de validación de técnicas analíticas donde se establece que el %CV

debe estar por debajo del 20% (6).

Las condiciones experimentales y la alta sensibilidad del  $\mu$ ECD permitieron LOD por debajo de 0,58 ppb y LOQ entre 1,75 ppb para  $\gamma$ -BHC y 0,43 ppb para  $\delta$ -BHC (Tabla 2).

Con los principales números de mérito establecidos para la curva de calibración global de los 20 OCPs se procedió a evaluar un nuevo método de preparación de muestras.

- **Selección del solvente y número de extracciones**

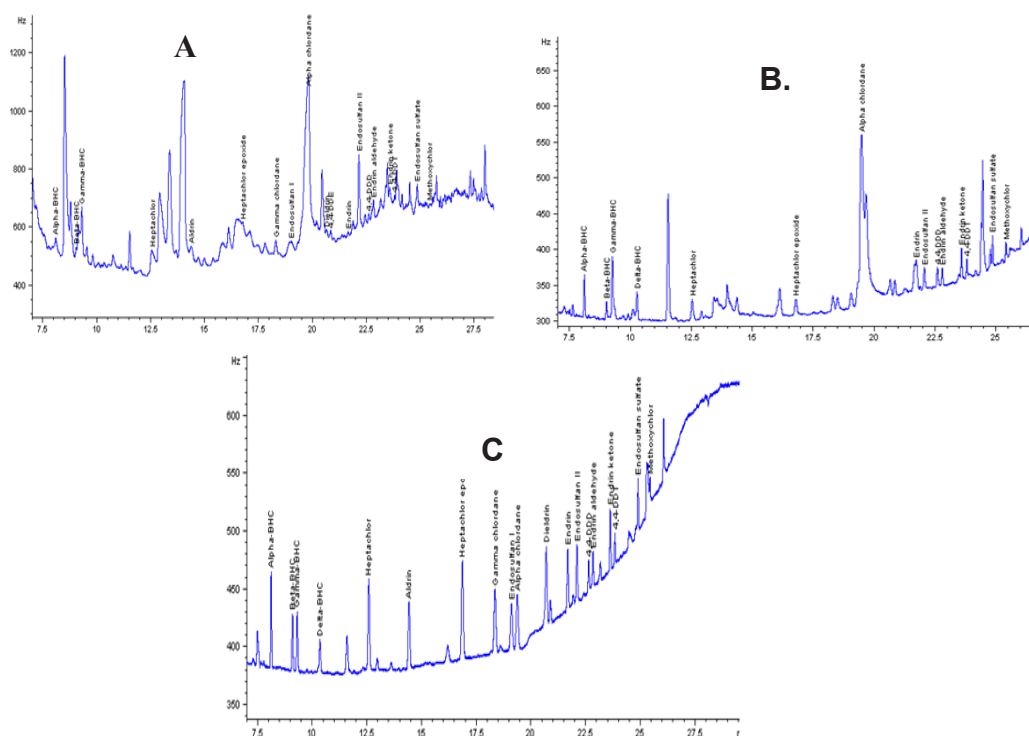
Los solventes evaluados (hexano, acetona, acetonitrilo) en la extracción de los OCPs del tejido adiposo presentaron notorias diferencias en el perfil cromatográfico obtenido (Figura 1). La selección del solvente se basó en el número de analitos resueltos, picos coeluidos, calidad de la línea base y disminución del efecto matriz, con los pasos LTP y *clean-up* ajustados para las pruebas. Mientras, hexano y acetona presentaron pobres perfiles cromatográficos, con acetonitrilo se logró un cromatograma con mejores características. Con acetona se extrajo casi el doble de coextractos y con hexano se extrajeron diferentes componentes de carácter apolar que dificultan la precipitación de las grasas a bajas temperaturas debido a su bajo punto de congelamiento (-95,3°C) (7). Para ambos solventes se evidenció una notable elevación de la línea base y mala resolución. (Figura 1A). El uso de acetonitrilo presentó el mejor comportamiento en el LTP-Clean up evidenciado en el perfil cromatográfico de la extracción realizada. Por lo tanto, se seleccionó como el solvente de extracción.

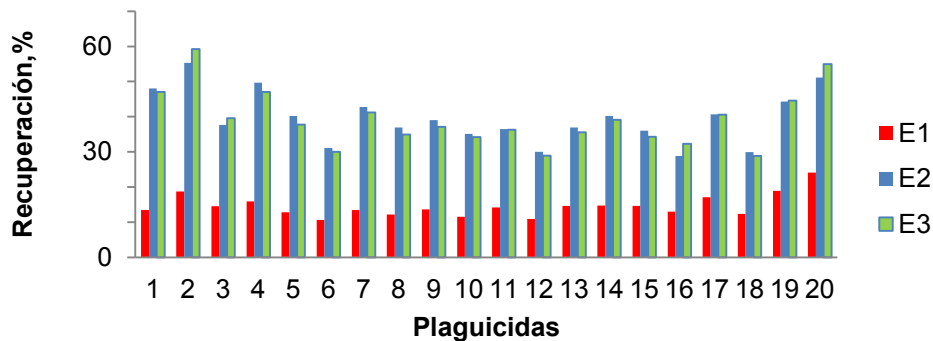
El número de extracciones sucesivas fue establecido con el porcentaje de recuperación (%Rec). Para cada una de las extracciones el procedimiento de preparación y extracción del tejido adiposo fue el mismo y se hizo por triplicado. Como se observa en la Figura 2, dos extracciones eran suficientes para recuperar la mayor cantidad de los analitos. E1, E2 y E3 corresponden a una, dos y tres extracciones respectivamente.

El análisis de los resultados del diseño estadístico permitió establecer que el tiempo en ultrasonido (10 min) es la variable que mas afecta la extracción con un nivel de significancia de 0,05. Esto es acorde con lo reportado por Ramos (2012), donde después de 20 min de ultrasonido las recuperaciones no son eficientes (4); esto se debe al parecer a la degradación de los plaguicidas durante el proceso de extracción. Se estableció entonces que las mejores condiciones para la recuperación

**Tabla 2.** Linealidad, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), sensibilidad y repetitividad

N° de ID	Plaguicidas	$t_R$	$^a R^2$	$^b m$	$^c b$	LOD (ppb)	LOQ (ppb)	Repetitividad (área), (n=3), %CV		
								10 ppb	100 ppb	500 ppb
1	$\alpha$ -BHC	8,12	0,998	36,23	208,55	0,17	0,51	6,1	3,9	5,0
2	$\beta$ -BHC	9,09	0,999	15,23	231,90	0,14	0,44	4,4	4,1	4,8
3	$\gamma$ -BHC	9,31	0,978	41,81	-693,68	0,58	1,75	5,3	4,1	5,1
4	$\delta$ -BHC	10,35	0,999	31,38	206,08	0,14	0,43	3,7	4,5	4,8
5	Heptachlor	12,59	0,999	32,27	385,25	0,17	0,52	5,1	4,1	5,3
6	Aldrin	14,44	0,999	33,96	401,30	0,17	0,51	4,2	4,1	5,4
7	Heptachlor epoxide	16,87	0,999	29,95	462,86	0,15	0,45	2,6	4,1	5,2
8	$\gamma$ -chlordane	18,39	0,999	32,32	445,57	0,15	0,47	2,2	4,5	5,3
9	Endosulfan I	19,14	0,999	28,78	496,27	0,15	0,45	1,9	4,3	5,3
10	$\alpha$ -chlordane	19,41	0,999	31,88	497,13	0,16	0,48	2,0	4,4	5,5
11	Dieldrin	20,73	0,999	29,75	444,28	0,15	0,45	1,1	4,4	5,2
12	4,4-DDE	20,92	0,999	31,92	493,71	0,16	0,47	1,2	4,3	5,1
13	Endrin	21,71	0,999	27,15	433,26	0,15	0,45	0,9	4,5	5,0
14	Endosulfan II	22,13	0,999	25,99	437,42	0,17	0,50	2,3	4,7	4,4
15	4,4-DDD	22,66	0,998	25,28	233,14	0,16	0,49	0,5	4,9	4,9
16	Endrin aldehyde	22,86	0,999	19,38	391,69	0,17	0,50	1,6	4,6	4,5
17	Endrin ketone	23,65	0,999	22,41	323,36	0,18	0,56	2,5	5,1	4,2
18	4,4-DDT	23,86	0,999	24,58	190,77	0,18	0,55	0,5	5,2	5,0
19	Endosulfan sulfate	24,92	0,999	24,20	336,34	0,18	0,56	2,0	5,0	3,9
20	Methoxychlor	25,47	0,999	11,13	179,77	0,20	0,61	2,4	5,1	4,5

<sup>a</sup> Coeficiente de correlación; <sup>b</sup> Pendiente (Sensibilidad); <sup>c</sup> Intercepto,**Figura 1.** Perfil cromatográfico de extracción de OCPs en tejido adiposo. A. Hexano. B. Acetona. C. Acetonitrilo



1,  $\alpha$ -BHC; 2,  $\beta$ -BHC; 3,  $\gamma$ -BHC; 4,  $\delta$ -BHC; 5, Heptacloro; 6, Aldrin; 7, Heptacloro epóxido; 8,  $\gamma$ -Clordano; 9, Endosulfan I; 10,  $\alpha$ -Clordano; 11, Dieldrin; 12, 4,4'-DDE; 13, Endrin; 14, Endosulfan II; 15, 4,4'-DDD; 16, Endrin aldehído; 17, Endrin cetona; 18, 4,4'-DDT; 19, Endosulfan sulfato; 20, Metoxicloro.

Figura 2. Efecto de número de extracciones sobre el porcentaje de recuperación

de los OCPs fueron: tejido adiposo (1 g), acetonitrilo (2 mL) y ultrasonido (10 min). Empleando las condiciones establecidas se alcanzaron recuperaciones promedio de 86,2%, con excepción del aldrin, 4,4' DDE, endrin aldehído y 4,4' DDT en donde sus porcentajes de recuperación fueron inferiores al 70%. No obstante, para el metoxicloro aunque se obtienen recuperaciones mayores al 70%, la integración de su pico cromatográfico se ve afectado por su baja resolución y poca simetría, sugiriendo una posible coelusión con algún componente de la matriz. Esto genera un incremento en la señal del analito reflejándose directamente en su cuantificación (Figura 3).

• **Evaluación de la repetitividad del método de extracción para tiempos de retención ( $t_R$ ) y áreas**

En la Tabla 3 se muestran los resultados para la evaluación de la repetitividad del tiempo de retención ( $t_R$ ) y de las áreas bajo la curva de cada analito. Los resultados no presentaron una desviación considerable entre las mediciones. Para el  $t_R$ , los coeficientes de variación estuvieron por debajo de 0,07%, indicando la buena precisión del método. Para las áreas los coeficientes de variación se ubicaron entre 15 y 25%, aceptados para muestras con alto contenido graso (7,8) con coeficientes de variación validos entre 20 y 30%, debido a la complejidad e influencia de las interferencias de la matriz, que puede causar supresión y/o incremento de la señal.

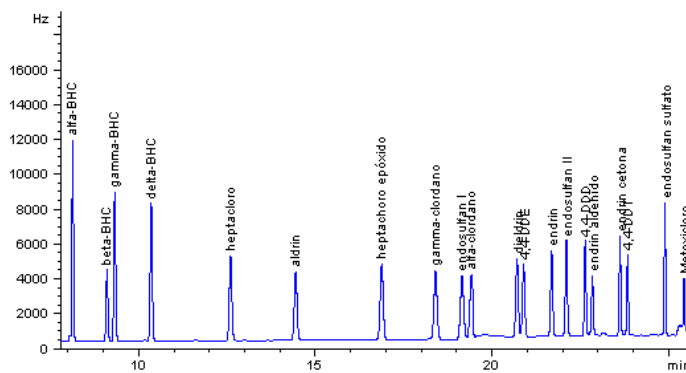


Figura 3. Perfil cromatográfico de la extracción de OCPs de tejido adiposo asistida por ultrasonido

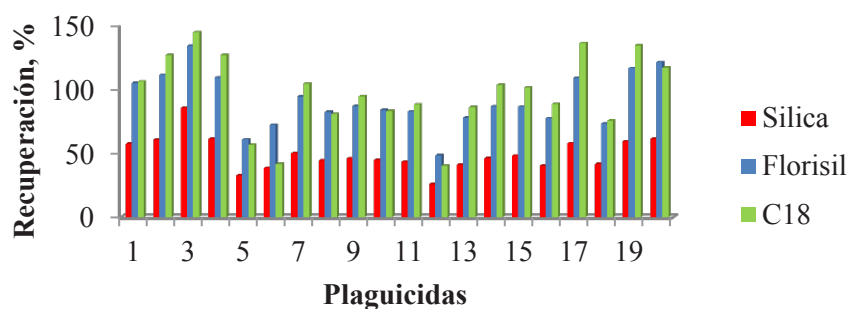
**Tabla 3.** Repetitividad de  $t_R$  y Áreas de los OCPs analizados por GC- $\mu$ ECD

N° de ID	Plaguicidas	$t_R$			ÁREA		
		<X>	SD	%CV	<X>	SD	%CV
1	$\alpha$ -BHC	8,12	0,006	0,07	2271	373	16,4
2	$\beta$ -BHC	9,09	0,006	0,07	1163	190	16,4
3	$\gamma$ -BHC	9,31	0,006	0,07	2108	354	16,8
4	$\delta$ -BHC	10,35	0,008	0,07	1994	361	18,1
5	Heptachlor	12,59	0,007	0,06	1807	352	19,5
6	Aldrin	14,44	0,008	0,06	1642	345	21,0
7	Heptachlor epoxide	16,87	0,008	0,05	1944	351	18,1
8	$\gamma$ -chlordane	18,39	0,009	0,05	1851	388	21,0
9	Endosulfan I	19,14	0,008	0,04	1781	350	19,6
10	$\alpha$ -chlordane	19,41	0,009	0,05	1924	392	20,4
11	Dieldrin	20,73	0,006	0,03	1747	348	19,9
12	4,4-DDE	20,92	0,007	0,03	1733	361	20,8
13	Endrin	21,71	0,004	0,02	1552	307	19,8
14	Endosulfan II	22,13	0,005	0,02	1657	319	19,3
15	4,4-DDD	22,66	0,005	0,02	1373	255	18,6
16	Endrin aldehyde	22,86	0,004	0,02	1210	235	19,4
17	Endrin ketone	23,65	0,004	0,02	1396	304	21,8
18	4,4-DDT	23,86	0,004	0,02	1301	268	20,6
19	Endosulfan sulfato	24,92	0,002	0,01	1479	356	24,0
20	Methoxychlor	25,47	0,003	0,01	800	124	15,5

#### • Reproducibilidad

Se estableció la reproducibilidad del método evaluando la capacidad de diferentes sorbentes (florisil, silica, y C18) de remover los coextractos generados durante el proceso. La preparación y extracción del tejido adiposo se realizó con las condiciones establecidas, usando acetoneitrilo como solvente de elusión. El comportamiento de las fases evaluadas se aprecia en la Figura 4. Las máximas recuperaciones (>70 %) se presentan para el

florisil y el C18, esto se debe principalmente a la naturaleza apolar de las fases estacionarias, que retienen los componentes interferentes de la matriz mientras los analitos son eluidos. El solvente de elusión está estrechamente relacionado con la naturaleza del material adsorbente; normalmente se obtienen extractos relativamente limpios cuando se usan solventes polares o de polaridad intermedia esto se reflejó en el incremento de los porcentajes de recuperación de los analitos (6).



1,  $\alpha$ -BHC; 2,  $\beta$ -BHC; 3,  $\gamma$ -BHC; 4,  $\delta$ -BHC; 5, Heptachloro; 6, Aldrin; 7, Heptachloro epóxido; 8,  $\gamma$ -Clordano; 9, Endosulfan I; 10,  $\alpha$ -Clordano; 11, Dieldrin; 12, 4,4'-DDE; 13, Endrin; 14, Endosulfan II; 15, 4,4'-DDD; 16, Endrin aldehído; 17, Endrin cetona; 18, 4,4'-DDT; 19, Endosulfan sulfato; 20, Metoxicloro.

**Figura 4.** Efecto de los sorbentes sobre el porcentaje de recuperación



## CONCLUSIONES

- Se estableció un método rápido, sencillo y económico, acorde con los conceptos de la química analítica verde, para extracción y análisis de plaguicidas organoclorados en tejido adiposo.
- Se validó el método de extracción asistida por ultrasonido para el análisis de OCPs en tejido adiposo por GC- $\mu$ ECD a través de los números analíticos de mérito. El método fue sensible y logró la detección de los OCPs por debajo de 0,58 ppb, fue lineal con  $R^2 \geq 0,978$ ; preciso en términos de  $t_r$ , con  $\%CV \leq 0,07$ . Se obtuvo reproducibilidad con la variación del adsorbente, florisil o C18, en el *clean up*, con porcentajes de recuperación por encima de 70% en ambos casos.

---

## BIBLIOGRAFÍA

1. Huber Po-on Tang. "Recent development in analysis of persistent organic pollutant under the Stockholm Convention". Trends in Analytical Chemistry. 2013; Vol.45. pp 48-66.
2. Weiguang Xu, Wang Xi y Cai Zongwei. 2013. In press. "Analytical chemistry of persistent organic pollutant indentified in the Stockholm Convention: A review". Analytical Chimica Acta.
3. Martial LeDoux. 2011. "Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in food animal origin. A review of the past two decades". Journal of chromatography A. Vol. 1218. pp 1021-1036.
4. L. Ramos. "Review: Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques". Journal of Chromatography A. 2012; Vol 1221. pp 84-98.
5. Bacoloni A. "Determination of aflatoxins in halzenuts by various simple preparation methods and liquid chromatography-tandem mass spectrometry". Journal of Chromatography A. 2008; Vol 1179. pp 182-189.
6. González A., Herrador, A. "A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles". Trends in Analytical Chemistry. 2007; Vol. 26. pp 227-238.
7. Halimah M., Badrul H., Nor Kartini. "A. Comparative study of different clean up techniques for the determination of  $\lambda$ -cyhalothrin and cypermethrin in palm oil matirces by gas chromatography with electron capture detection". Food Chemistry. 2012; Vol. 134. pp. 2479-2496.
8. M. García-Altare., J.Dioège., P. de la Iglesia. "The implementation of liquid chromatography tandem mass spectrometry for the official control of lipophilic toxins in seafood: Single-laboratory validation under four chromatographic conditions". Journal of Chromatography A. 2013; Vol.1275. pp.48-60.