

Comunicación breve

Técnica multiresiduos aplicada a la determinación de plaguicidas en meconio por cromatografía gaseosa

RECIBIDO: 29/06/2011

ACEPTADO: 22/09/2011

Marino, F. • de la Sierra, P. • Lorenzatti, E. •
Maitre, M. I. • Enrique, S. • Lenardón, A.

Laboratorio de Medio Ambiente, INTEC (CONICET/UNL), Santa Fe, Argentina. Güemes 3450 (3000), Santa Fe. Tel: 0342-4559171/7.
E.mail: fmarino@santafe-conicet.gob.ar

RESUMEN: El objetivo de este estudio es la modificación y puesta a punto de una técnica para el análisis de plaguicidas en meconio, considerando a este como una matriz similar a alimentos con bajo contenido de grasa. Para ello se le realizan ajustes a una técnica multiresiduos para optimizar el análisis cuali y cuantitativo de las sustancias de interés. La identificación y cuantificación se realizó por cromatografía gaseosa con detectores ECD y TSD. Para definir el grupo de analitos a buscar en las muestras, se tuvieron en cuenta las características de uso en la región donde se realizará un monitoreo, además de la persistencia y toxicidad de los plaguicidas y algunos metabolitos: Endosulfán (I y II), Endosulfán Sulfato, op-DDT, pp-DDT, op-DDE, Endrin, Clorpirifós Etil y Metil, Diazinón, Pirimifós Metil, Diclorovós, 4-Nitrofenol, 2-Isopropil-6-Metil-4-Pirimidol y 3-Acido fenoxibenzoico. Para validar

el método se realizan siembras en la matriz, con estándares certificados de los analitos seleccionados. Los porcentajes de recuperación están entre 70 y 111% y los límites de cuantificación entre 0,01 y 4,05 $\mu\text{g/g}$.

PALABRAS CLAVE: meconio, pesticidas, metabolitos, exposición prenatal.

SUMMARY: *Multiresidue method for the analysis of pesticide in meconium by gas chromatography.*

The aim of our study is to develop a simple, fast and cheap method to evaluate pesticide residues in the matrix meconium, considering this as a matrix similar to food with low fat content.

Adjustments to the multiresidue technique were conducted to optimize the analysis qualitative and quantitative of the substances of interest.

In order to define the group of analytes

to find in the samples, we took into account the characteristics of application, persistence and toxicity of pesticides and some metabolites: Endosulfan (I and II), Endosulfan Sulphate, op-DDT pp-DDT, op-DDE, Endrin, Chlorpyrifos ethyl and methyl, Diazinon, Pirifos methyl, Dichlorvos, 4-nitrophenol, 2-propyl-6-imethyl-4-

pyrimidol and 3-phenoxybenzoic acid. Identification and quantification was carried out by gas chromatography with ECD and TSD detectors. The recovery percentages are between 70 and 111% and the limits of quantification between 0.01 and 4.05 $\mu\text{g/g}$. **KEYWORDS:** meconium, pesticides, metabolites, prenatal exposure.

Introducción:

Debido a la amplia distribución que tienen los plaguicidas en el ambiente, se hace necesario desarrollar métodos adecuados para cuantificar la presencia de estos y sus metabolitos en la población expuesta, sea este en forma directa por razones laborales, de hábitat, así como ocasionales y alimentarias. Esto tiene particular importancia en un período vulnerable del desarrollo, como es la gestación.

Gran parte de los estudios sobre exposición prenatal a plaguicidas (1,2,3), utilizan como matriz de estudio sangre del cordón umbilical, orina de la madre u orina del neonato. Como alternativa, en los últimos años se propone utilizar el meconio, ya que es fácilmente disponible, es inerte y acumula los neurotóxicos y/o sus metabolitos desde la semana 12 de gestación donde quedan "almacenados" hasta el nacimiento (1). Este constituye las primeras deposiciones del recién nacido. De acuerdo a la bibliografía, alrededor del 70% de los recién nacidos inician la expulsión del meconio en las primeras 12 horas; el 93% en las primeras 24 horas y el 99,8% en el transcurso de las 48 horas después del nacimiento. Tiene un aspecto verde-negruzco viscoso y es muy pegajoso; está formado por: agua, lípidos, proteínas, esteroides y precursores del

colesterol, ácidos grasos libres principalmente, además de otros productos particulares derivados de la deglución del líquido amniótico, células epiteliales, bilis y secreciones intestinales.

Uno de los grupos de plaguicidas a analizar es el de los organoclorados, debido a su elevado tiempo de permanencia en el ambiente y sus reconocidos efectos tóxicos. Existen trabajos donde se informa el hallazgo de estos plaguicidas en distintos fluidos humanos, incluyendo el meconio (1 a 11). Dentro de los organoclorados tiene particular relevancia el Endosulfán que es un plaguicida altamente tóxico y muy utilizado actualmente, especialmente en los cultivos de soja (12), tomate, tabaco y algodón. Si bien es menos persistente que los demás organoclorados, uno de sus metabolitos mayoritarios, el Endosulfán Sulfato, también es altamente tóxico.

Los organofosforados son poco persistentes pero de alta toxicidad, al igual que varios de sus productos de degradación. En general, se monitoreaban estos plaguicidas en orina o sangre de cordón; pero para que estos sean detectados, la exposición de la madre debería ser relativamente reciente y los niveles encontrados en estos análisis son muy bajos (5,9). Los trabajos más actuales señalan a los metabolitos de

los organofosforados, como los objetivos de análisis en muestras biológicas ya que detectando estos productos de degradación, es posible inferir la exposición de la madre a los plaguicidas que les dieron origen (3, 8, 9, 10).

Por otra parte, el uso de los piretroides está ampliamente difundido en la actualidad, con la peligrosa idea por parte de la población en general, de que son "inocuos". Estos plaguicidas, producen una toxicidad aguda mucho menor que los organofosforados, pero están lejos de ser inofensivos desde el punto de vista crónico. Son los más utilizados en viviendas, jardines y en preparados insecticidas para humanos y mascotas. A pesar de su uso tan difundido, todavía la investigación e información sobre sus efectos (y los de sus metabolitos) en humanos no está muy profundizada. Los datos encontrados en la bibliografía, indican que si bien difícilmente se encuentren los principios activos originales, si es frecuente el hallazgo de sus productos de degradación (9,10).

Dentro de las matrices de interés en estudios de exposición poblacional, se señala como muy indicada al meconio para encontrar los metabolitos finales de la degradación de los organofosforados, debido a su característica de "acumulador" de xenobióticos a partir de la doceava semana de embarazo.

El meconio constituye una matriz compleja a la hora de seleccionar una técnica analítica sencilla, eficaz y con un nivel de detección útil que permita extraer, identificar y cuantificar los compuestos deseados por lo que se propone ajustar una técnica multiresiduos de dispersión en fase sólida (13, 14). Esta fue desarrollada originalmente para determinar plaguicidas en vegetales,

es decir matrices de alto contenido acuoso, pero debido a sus ventajas fue adaptada para determinar plaguicidas en matrices con materia grasa.

Material y Método

Se utiliza un cromatógrafo de gases VARIAN 3400, provisto con una columna capilar DB-1017 conectada a un detector de captura electrónica (ECD) y una columna Megabore DB-5, conectada a un detector termiónico específico (TSD). Se opera con temperatura de inyector de 240°C, temperatura de horno de 220°C y temperatura de detector de 340°C. Se emplea nitrógeno como gas carrier.

Se utilizan estándares certificados de los plaguicidas y metabolitos para la calibración del equipo y para la fortificación de las muestras.

En función de la relevancia y las posibilidades de análisis se define el siguiente listado de analitos objeto, para los cuales se incluye entre paréntesis el dato de marca y pureza:

Plaguicidas organoclorados: Endrin (Chem Service 99%), op-DDT y pp-DDT (Chem Service mix 65,6% y 32,0%), op-DDE (Chem Service 99,5%), Endosulfán I y II (Chem Service mix 59,2% y 39,9%). Metabolito: Endosulfán Sulfato (Fluka 98,5%).

Plaguicidas organofosforados: Etil Clorpirifós (Chem Service 99,5%), Metil Clorpirifós (Chem Service 99,5%), Diazinón (Chem Service 99,4%), Metil Pirimifós (Chem Service 99,3%) y Diclorvos (Fluka 98,9%). Metabolitos: 4-Nitrofenol (AccuStandard 99%) y 2-Isopropil-6-Metil-4-Pirimidinol ó IMPY (Chem Service 99,5%).

Metabolito de piretroides más utilizados: 3-Acido fenoxibenzoico ó 3-PBA (Chem Service 99,5%).

A la técnica original (13) que incluye una limpieza por dispersión en fase sólida utilizando sulfato de magnesio (Anedra heptahidratado, muflado a 500 °C durante 1 hora) y PSA (etilendiamina-n-propil, VARIAN 40 μm) como adsorbente, se le agrega C18 (Waters 37-55 μm 125 Å) para las grasas y CG (carbono grafitizado, Waters) para los pigmentos. Se probaron distintas combinaciones de adsorbentes, hasta obtener la que resultó óptima para la matriz.

El rango lineal de operación para el análisis cromatográfico se determina mediante ensayos previos y las curvas de calibrado para cada analito se obtienen mediante tres réplicas para cinco niveles de concentración, dentro del rango de trabajo adecuado para cada plaguicida, utilizando una regresión lineal por el método de los cuadrados mínimos. En la Tabla 1, se muestran las condiciones relevantes para el análisis de los plaguicidas, el rango lineal de trabajo y el cuadrado del coeficiente para la correlación lineal.

Tabla 1. Condiciones de trabajo y calibración en el rango lineal de operación.

Analito	Condiciones operativas	Rango lineal	r ²	
Endosulfan I	CG VARIAN 3400/ECD	10 – 80 pg	0,998	
Endosulfan II	Col. Capilar 1017		0,999	
Endosulfan Sulfato	Carrier: Nitrógeno		0,998	
op-DDT	Temp. detector: 340°C		0,986	
pp-DDT	Temp. inyector: 240 °C		0,989	
op-DDE	Temp. Columna: 220 °C		0,995	
Endrin			0,996	
4-Nitrofenol			500 a 1000 pg	0,997
IMPY				0,995
3-PBA				0,983
Clorpirifos Etil	CG VARIAN 3400/TSD	20 – 100 pg	0,992	
Clorpirifos Metil	Col. Megabore DB-5		0,994	
Diazinon	Carrier: Nitrógeno	100 – 500 pg	0,998	
Pirimifos Metil	Temp. detector: 340°C		0,997	
Diclorvos	Temp. inyector: 240 °C		0,996	
	Temp. Columna: 220 °C			

Para el análisis de las muestras (fortificadas y blancos), se pesan 5 g de muestra en un tubo de centrífuga de 50 ml con tapón a rosca, se adicionan 2,5 g de agua (Fisher, grado HPLC) y se agita hasta homogeneizar bien. En el caso de las muestras fortificadas, en este punto se realiza la siembra de los analitos en la concentración adecuada.

Luego se agrega 15 ml de solvente de extracción: ácido acético (Merck RA) al 1% en acetonitrilo (Sintorgan grado plaguicida).

Se agita durante 1 minuto y se lleva a 5°C durante 30 minutos. Se homogeneiza y se agregan las sales de extracción: 6 gramos de sulfato de magnesio anhidro y 1,5 gramos de acetato de sodio (Anedra RA), agitando inmediatamente durante 1 minuto. Después se centrifuga durante 5 minutos a 3000 rpm y se recoge 6 ml de sobrenadante, los que se transfieren a un tubo de centrífuga de 15 ml con tapón a rosca conteniendo la mezcla de limpieza (150 mg de

PSA, 150 mg de C18, 50 mg de CG y 900 mg de sulfato de magnesio). Se agita inmediatamente durante 1 minuto y se centrifuga a 2000 rpm durante 2 minutos. Se recoge 4 ml de sobrenadante, se le agrega dos gotas de dodecano (Merck 99%), se evapora el acetonitrilo, se redissuelve en hexano (Sintorgan grado plaguicida) y se procede al análisis por cromatografía gaseosa.

Al extracto final, se le cambia el solvente antes de inyectar la muestra en el cromatógrafo gaseoso con lo que se logra mejorar la recuperación de los analitos en las muestras fortificadas, agregando unas gotas de dodecano al extracto antes de evaporar el acetonitrilo y redissolver en hexano.

Resultados

Los límites de cuantificación se calcularon a partir de los ensayos de calibración, con-

siderando los parámetros de las curvas de regresión lineal (15). Con esta metodología se utiliza la desviación estándar de la regresión como un estimador del desvío estándar del blanco, los datos de ordenada al origen como el estimador de la señal del blanco y la pendiente de la recta de calibrado.

Los ensayos de recuperación se realizaron por triplicado para tres niveles de concentración y el porcentaje de recuperación se calculó a partir de la pendiente de la recta de la regresión lineal de las gráficas de cantidad recuperada versus cantidad sembrada para cada analito.

En la Tabla 2, se resumen los porcentajes de recuperación del método para cada analito habiéndose usado tres niveles de concentración. A su vez se listan los límites de cuantificación obtenidos con este procedimiento para los plaguicidas estudiados.

Tabla 2. Porcentajes de recuperación y límites de cuantificación para el análisis.

Analito	Recuperación (%)	Coefficiente de correlación de la regresión (r^2)	Límite de cuantificación ($\mu\text{g/g}$)
Endosulfan I	84	0,996	0,02
Endosulfan II	89	0,978	0,01
Endos. Sulfato	91	0,978	0,08
op-DDT	72	0,986	0,13
pp-DDT	70	0,984	0,15
op-DDE	73	0,973	0,09
Endrin	111	0,993	0,12
4-Nitrofenol	79	0,970	4,05
IMPY	88	0,985	3,80
3-PBA	71	0,976	3,91
Clorpirifos Etil	105	0,992	0,28
Clorpirifos Metil	97	0,989	0,32
Diazinon	77	0,969	0,45
Pirimifos Metil	95	0,992	0,37
Diclorvos	87	0,980	0,35

Conclusiones

Las variaciones introducidas a la técnica permitieron obtener una metodología fácil de ejecutar, precisa y reproducible para ser utilizada en la determinación de plaguicidas en meconio.

Si se compara esta técnica con otras aplicadas a esta matriz (2,3), resulta un procedimiento más sencillo, se reduce considerablemente el consumo de solventes y consecuentemente, la generación de residuos peligrosos.

Se lograron buenos resultados a pesar de la complejidad de la matriz, eliminando en forma satisfactoria la interferencia cromatográfica que implica la presencia natural de lípidos y pigmentos en este tipo de muestras, a partir del ajuste de las cantidades de adsorbentes: C18 y CG utilizados.

El acetonitrilo, usado frecuentemente como solvente de extracción en muestras de bajo contenido lipídico, resultó adecuado para el meconio. En esta etapa se observó que mejoraba la recuperación de los analitos si se enfriaba la mezcla: muestra/acetonitrilo, antes de proceder al secado en el tubo de extracción.

Bibliografía

1. Ortega García, J. A.; Carrizo Gallardo, D.; Ferrís i Tortajada, J.; Macián, A. M. y Grimalt, J. O. 2002. Meconio y exposición prenatal a neurotóxicos. *Rev. Esp. Pediatr.* **60**, 4: 291-296.
2. Bielawski, D.; Ostrea Jr., E.; Posecion Jr. N.; Corrion, M. y Seagraves, J. 2005. Detection of several classes of pesticides and metabolites in meconium by gas chromatography/ mass spectrometry. *Chromatographia.* **62**, 6: 623-629.
3. Whyatt, R. M. and Barr, D. B. 2001. Measurement of organophosphate metabolites in postpartum meconium as a potential biomarker of prenatal exposure: A validation study. *Environmental Health Perspectives.* **109**, 4: 417-420.
4. Hong, Z. y Günter, M. 2002. Meconium: A matrix reflecting potential fetal exposure to organochlorine pesticides and its metabolites. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* *Environmental Research*, **Section B**, 51: 60-64.
5. Barr, D. B. ; Bishop, A. y Needham, L. L. 2007. Concentrations of xenobiotic chemicals in the maternal-fetal unit. *Reproductive Toxicology.* **23**, 3: 260-266.
6. Wessels, D.; Barr, D. B. y Mendola, P. 2003. Use of biomarkers to indicate exposure of children to organophosphate pesticides: implicaciones for a longitudinal study of children's environmental health. *Environmental Health Perspectives.* **111**, 16: 1939-1946.
7. Heudorf, U. y Angerer, J. 2001. Metabolites of organophosphorous insecticides in urine specimens from inhabitants of a residential area. *Environmental Research*, **86**, 1: 80-87.
8. Bradman, A.; Barr, D. B. ; Claus Henn, B. G. ; Drumheller, T. ; Curry, C. Y Eskenazi, B. 2003. Measurement of pesticides and other toxicants in amniotic fluid as a potential biomarker of prenatal exposure: A validation study. *Environmental Health Perspectives.* **111**, 14: 1779-1782.
9. Perry, M.; Venners, S. A. ; Barr, D. B. Y Xu, X. 2007. Environmental pyrethroid and organophosphorus insecticide exposures and sperm concentration. *Reproductive Toxicology.* **23**, 1: 113-117.
10. Heudorf, U.; Butte, W.; Schulz, C. Y Angerer, J. 2006. Reference Values for Metabolites of Pyrethroid and Organophosphorous Insecticides in Urine for Human Biomonitoring in Environmental Medicine. *Int. J. Hyg. Environ.-Health.* **209**, 3: 293-299.
11. Barr, D. B.; Bravo, R.; Weerasekera, G.; Caltabiano, L. M.; Whitehead Jr., R. D.; Olsson, A. O.; Caudill, S. P.; Schober, S. E.; Pirkle, J. L.; Sampson, E. J.; Jackson, R. J. Y Needham, L. L. 2004. Concentrations of dialkyl phosphate

metabolites of organophosphorus pesticides in the U.S. population. *Environmental Health Perspectives*. **112**, 2: 186-200.

12. Lorenzatti, E.; de la Sierra, P.; Marino, F. y Lenardón, A. 2006. Acumulación y persistencia del insecticida endosulfán en soja, como posible factor de contaminación ambiental y alimentaria. *FABICIB*. **10**: 107-111.

13. Anastassiades, M. y Lehotay, S. J. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* **86**, 2: 412-431.

14. Fernández Alba, A. R. 2005. "Comprehensive analytical chemistry. Chromatographic-mass spectrometric food analysis for trace determination of pesticide residues". *Wilson & Wilson's. Elsevier (Barcelona)*, Vol. XLIII.

15. Miller, J. C. and Miller, J. N. 1988. "Estadística para Química Analítica. 2^{da}Ed". *Addison Wesley Iberoamericana (USA)*.