

## Optimización de la dispersión de matriz en fase sólida asistida por ultrasonido para el análisis de bifenilos policlorados en placenta humana

Alexander Guarenas Manzano <sup>a</sup>, Maribel Valero Villamizar. <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química. Universidad Politécnica Territorial Alonso Gamero. Avenida Libertador. 4101 Santa Ana de Coro, Falcón República Bolivariana Venezuela. aguarenasm@yahoo.com

<sup>b</sup>Laboratorio de Espectroscopia Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes, Departamento de Química. La Hechicera. Mérida 5101-A. República Bolivariana Venezuela. luigi@ula.ve

**Resumen:** Se desarrolló un método de dispersión de matriz en fase sólida asistida con ultrasonido (DMFS-AU) para la extracción y limpieza simple, rápida de residuales de bifenilos policlorados (BPCs) en placenta humana. Se empleó la metodología de superficie respuesta (MSR) para optimizar las condiciones del método. Las condiciones que maximizaron los porcentajes de recuperación fueron: Florisil como dispersante de matriz en una relación con la muestra de (m/d: 0,5/3 m/m) y como adsorbente de limpieza (1g), 23,1 mL de una mezcla n-hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1 v/v) como eluyente y 33,4 min de tiempo de sonicación. El procedimiento desarrollado se aplicó a muestras de placenta a tres niveles de enriquecimiento (25, 50 y 100 ng g<sup>-1</sup>) con recuperaciones en el rango de 86,80 (± 2,12) a 102,64 % (± 4,66) y desviaciones estándar relativa (DERs) inferiores a 8.8%. La eficiencia de extracción del método optimizado es comparable con la extracción tradicional Soxhlet. El procedimiento propuesto requiere de volúmenes pequeños de solvente y muestra. Se detectaron al menos dos BPCs en cinco muestras colectadas.

**Palabras claves:** Placenta, bifenilos policlorados, DMFS, ultrasonido.

### 1 Introducción

Los Bifenilos Policlorados (BPCs) comprenden un grupo de 209 compuestos aromáticos clorados, que se han utilizado comercialmente desde 1930 en diversas aplicaciones industriales y comerciales [1-4]. Su alta liposolubilidad, bioacumulación y resistencia a la biodegradación en tejidos grasos [2,3,6] suponen riesgos considerables al ser humano.

Diversos estudios epidemiológicos vinculan a estos contaminantes con desordenes en el desarrollo del sistema reproductivo, endocrino e inmunológico, así de desordenes en el desarrollo cognitivo, deficiencia neurológica y cáncer en la población [6,7,8].

La exposición de embarazadas a estos disruptores endocrinos da lugar a efectos tóxicos tanto a la madre como al embrión/feto por los diversos mecanismos de transferencia transplacentaria que presentan estos compuestos de bajo peso molecular lo cual es una fuente importante de exposición para los hijos durante el período pre y neonatal, cuando los mecanismos de defensa del feto contra estos agentes no están bien desarrollados. [6-9].

La placenta como órgano de intercambio materno-fetal es un tejido residual y disponible hospitalariamente para obtener información sobre el grado de impregnación materna de contaminantes y el grado de exposición del feto con el mínimo riesgo para ambos. [10,11-14].

El análisis de contaminantes en muestras biológicas, requiere del diseño de metodologías analíticas que produzcan resultados precisos y reproducibles. Un procedimiento analítico bien diseñado es una poderosa herramienta que puede aumentar la eficiencia del análisis al reducir el tiempo y costos.

La extracción convencional de analitos orgánicos es una técnica que requiere de tiempo y dinero; comienza con una etapa de homogeneización, seguida de la extracción, limpieza y la purificación del extracto para eliminar impurezas antes de la separación cromatográfica además del uso de gran cantidad de muestra y alto consumo de disolventes. [15,16]

En las últimas décadas, se han incorporado diversas innovaciones en los procedimientos y técnicas analíticas que pueden ser aplicados a la preparación de muestras para la extracción y determinación de compuestos tóxicos.

La dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) es un método de extracción relativamente reciente, desarrollado por Barker en 1989 para la extracción de muestras sólidas y semisólidas. [17,18]. El método ha sido ampliamente utilizado para el aislamiento de numerosos compuestos orgánicos en diversas matrices, entre ellas, frutas y vegetales [19,20,21] tejido muscular [22], huevos [23], peces, [24], tejido porcino [25] leche [26], cosméticos [27], polvo interior [28], orina [29], suero [30], placenta humana [31].

La DMFS comprende la homogeneización de la muestra, disrupción celular, fraccionamiento y purificación en un solo paso. El método implica la mezcla de muestra con cantidades del adsorbente para permitir la ruptura en pedazos más pequeños de la arquitectura de la muestra y su dispersión sobre la superficie del adsorbente que luego de ser empacados en una columna, son desorbidos con un disolvente orgánico adecuado. Se ha encontrado que el empleo de la asistencia ondas de alta frecuencia ultrasónica (AU) y por acción conjunta de la temperatura permiten una mayor penetración y contacto del solvente en la matriz incrementando la desorción y la transferencia de los analitos al solvente. [32-34]

Teniendo en cuenta lo anterior, este estudio reporta la utilidad analítica de la dispersión de matriz en fase sólida asistida con ultrasonido DMFS-AU en combinación con herramientas quimiométricas, que permiten la optimización de variables experimentales para la determinación simultánea empleando cromatografía de gases como técnica de determinación de Bifenilos Policlorados en placenta humana.

## 2 Materiales y métodos.

### 2.1 Reactivos y soluciones

Todos los solventes y reactivos empleados fueron de alta pureza: n-hexano C<sub>6</sub> (99,8%), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100%). El material adsorbente, empleado como dispersante, consistió de alúmina 90 neutra estandarizada 1097 (70-230mesh), el Florisil® (silicato de magnesio de 60-100 mesh) ambos de Merck (Darmstadt, Alemania.). El Octadecilsilano C18, adquirido de *Agilent Technologies* en cartuchos de 500 mg. se empleó como medio de limpieza. La alúmina y el Florisil® se activaron antes a 600 °C por 4 horas seguido de la adición de un 5% en peso de agua Milli-Q. [35].

Se empleó una mezcla de congéneres de bifenilos policlorados (BPCs): 1, 5, 29, 47, 98,154, y 171 (0,1 mg mL<sup>-1</sup> de cada componente) suministrado por *Accustandard* (New Haven, Connecticut USA. Las soluciones para el dopaje de muestra fueron preparadas por dilución del stock en hexano. Los cartuchos tipo jeringa de polietileno (10 mL de capacidad) empleados para la preparación de columnas de DMFS se lavaron consecutivamente con agua destilada y n-hexano y secados en corriente de nitrógeno. El Helio y Nitrógeno ambos (UAP 99,999%) usados como gas de arrastre y auxiliar, respectivamente fueron suministrado por (AGA, Venezuela)

### 2.2 Colecta y almacenamiento de muestra

Treinta y seis (N=36) muestras de placenta humana se recogieron durante seis meses de embarazadas a término admitidas en el Servicio de Ginecología del Hospital Universitario del que sirve al Estado Mérida, Venezuela.

Las muestras de tejido fueron limpiadas de tejido conectivo umbilical y exceso de sangre superficial con solución salina 0,9% y agua. Se tomó la parte central incluyendo lado fetal y materno y se lavó con suficiente solución salina 0,9% y agua bidestilada para luego cortarse en trozos pequeños y homogeneizarse en un procesador doméstico para almacenarse como submuestras en recipientes de polietileno en freezer antes del tratamiento de liofilizado.

### 2.3. Instrumentación.

La deshidratación de la muestra se llevó a cabo colocando por 24 horas en colectores de polietileno con nitrógeno líquido en un sistema de liofilización (*Lyovac® GT2. Leybold-Heraeus*). La muestra liofilizada en combinación con el sólido dispersante fueron empacados en cartuchos y tratados en un baño ultrasónico 1510, (47 KHz *Branson Danbury, Connecticut, EU*) a una temperatura de 37°C.

La cuantificación de los analitos se realizó en un cromatógrafo de Gases *Varian CP-3800* equipado con un detector de captura de electrones (CG-DCE) de <sup>63</sup>Ni.

Los analitos fueron separados en una columna capilar de base polisiloxano tipo CP Sil 19 CB de *Varian Inc.*, de dimensiones de 0,25 mm D.I., 0,25 µm y 30 m de longitud.

El programa de temperatura del horno aplicado fue el siguiente: Temperatura inicial: 150°C (0,5min); 30°C/min hasta 210°C (1min); 30°C/min hasta 240 (5 min); 30°C/min hasta 270°C (5.5 min). La temperatura del inyector fue de 220 °C en el modo Split 1:2. La temperatura del detector fue de 300 °C. El Helio se uso como gas portador a 1.0 mL min<sup>-1</sup> mientras que el nitrógeno usado como gas alterno a 35 mL min<sup>-1</sup> según los resultados de la optimización instrumental. Los datos así como los parámetros cromatográficos fueron monitoreados y controlados por el software *Varian Star Chromatography Workstation V 6.2*.

La identificación de picos se basó en la comparación de tiempos de retención con los estándares. La precisión en la medición de la señal analítica del detector se evaluó mediante ensayos de repetibilidad y reproducibilidad diaria e interdiaria. El tiempo total de corrida fue menor de 16 min para los siete Bifenilos policlorados.

#### 2.4. Dispersión de matriz en fase sólida asistida con ultrasonido (DMFS-AU)

Una muestra representativa de tejido liofilizado (0,5 g) liofilizada fue mezclada en relación 1:3 con la fase dispersante en un mortero de Agatha hasta obtener un polvo seco y homogéneo. La mezcla resultante fue transferida cuantitativamente y empacada en cartuchos de extracción en fase sólida tipo jeringa (10 mL) contentivo de membranas de separación interfaces y 1,00 ± 0,01g de Florisil actuando como adsorbente de limpieza.

Los cartuchos preparados fueron ligeramente comprimidos para eliminar espacios de aire interno. Un volumen de 23 mL de una mezcla de n-hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) se adicionó a la columna y luego la jeringa se tapó en la base para ser llevada al baño ultrasónico durante 33 min.

La elución de los BPCs se llevó a cabo en un colector de vacío (*Agilent Technologies, CA, USA*). Se aseguró la elución completa del solvente hasta el goteo final por presión positiva en la jeringa. El eluato extraído se concentró y el residuo se evapora y seca con una ligera corriente de nitrógeno y se reconstituye con 2mL de hexano para su análisis cromatográfico. Finalmente, 1 µL de este extracto se inyectó directamente dentro del sistema CG-DCE.

#### 2.5. Diseño experimental.

La optimización de las variables que maximizan la variable respuesta (%Recuperación porcentual de Analitos., %RA) se llevó a cabo mediante la aplicación de la Metodología de Superficie Respuesta (MSR) de segundo orden.

Un diseño compuesto central (DCC) 2<sup>3</sup> con seis puntos de la estrella colocados a una distancia del punto central para determinar las condiciones óptimas del proceso de extracción utilizando el procedimiento DMFS-AU. El valor de  $\alpha$  fue 1.682 para establecer la capacidad de rotación. [36,37].

Se requirieron diecisiete experimentos realizados al azar incluyendo tres puntos centrales. Las condiciones se enlistan en la tabla 1. Se empleo el paquete estadístico *Statgraphics Centurión XVI* versión Beta suministrado por Statpoint Technologies,

Inc., The Plains, Virginia, *EE.UU*) para generar la matriz experimental y evaluar los resultados.

### 3 Resultados y discusión.

Inicialmente se realizaron experimentos preliminares de naturaleza exploratoria con el adsorbente y el solvente para evaluar la eficiencia de extracción de DMFS, utilizando n-hexano,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y mezcla de ellos empleados como disolventes de elución, así como Florisil®,  $\text{C}_{18}$  y alúmina como materiales dispersante. Los resultados obtenidos

**Tabla 1.** Matriz de diseño experimental de compuesto central de tres variables para la determinación de la eficiencia de extracción de BPCs por DMFS-AU

Factores (X)	Niveles del factor			Axial ( $\alpha = 1,682$ )			
	(-)	(0)	(+)	$-\alpha$	$+\alpha$		
A: Muestra/ Dispersante	1:4 (0,25)	3:8(0,375)	1:2 (0,5)	0,165 <sup>a</sup>	0,585		
B: Volumen de solvente8(mL)	10	20	30	3,182	36,82		
C: Tiempo de sonificado (min.)	20	25	30	16,59	33,41		
Experimento.	Combinaciones de factores (X)						%RA
	Variables no codificadas			Variables reales			
	A	B	C	A	B	C	
1	-	-	-	0,25	10	20	45,7
2	-	-	+	0,25	10	30	91,8
3	-	+	-	0,25	30	20	97,6
4	-	+	+	0,25	30	30	102,3
5	+	-	-	0,5	10	20	81,3
6	+	-	+	0,5	10	30	99,5
7	+	+	-	0,5	30	20	80,4
8	+	+	+	0,5	30	30	62,8
9	$-\alpha$	-	0	0,165	20	25	91,4
10	$+\alpha$	-	0	0,585	20	25	94,6
11	0	$-\alpha$	0	0,375	3,1820	25	64,2
12	0	$+\alpha$	0	0,375	36,818	25	70,8
13	0	0	$-\alpha$	0,375	20	16,591	99,1
14	0	0	$+\alpha$	0,375	20	33,409	87,1
15	0	0	0	0,375	20	25	107,6
16	0	0	0	0,375	20	25	102,8
17	0	0	0	0,375	20	25	93,6

$$(a) Xr = \frac{\pm \alpha (X_{Mayor} - X_{menor}) + X_{Mayor} + X_{menor}}{2} (\alpha) = \text{Puntos axial (1,682)}$$

mostraron que la mezcla de: C<sub>6</sub>-CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub> y el Florisil presentan las mayores eficiencias de extracción de estos analitos (expresada como % de Recuperación de analitos de BPCs

### 3.1. Optimización del procedimiento de DMFS-AU

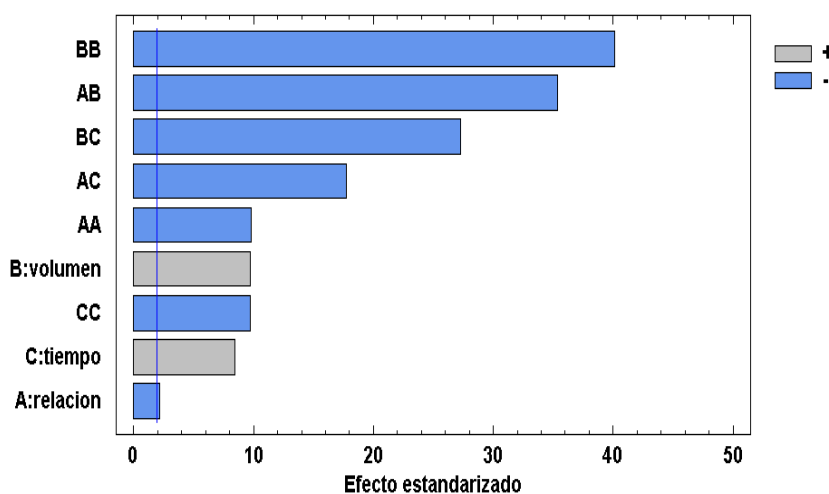
Para la optimización de los parámetros cuantitativos del método se utilizó, como dispersante y solvente extractante: Florisil y la mezcla 1:1 de C<sub>6</sub>-CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>, respectivamente, para la evaluación de la relación muestra/dispersante; volumen del eluente extractante y tiempo de sonificado.

Estos factores se optimizaron mediante la Metodología de Superficie Respuesta (MSR) aplicando un diseño de compuesto central rotatable (DCCR) (Tabla 1). Los efectos principales, efectos de interacción, así como los efectos cuadráticos se evaluaron mediante el análisis de varianza en muestras de tejido de placenta liofilizada fortificadas con 10 ng g<sup>-1</sup> con el estándar de BPCs. Las variables que van a tener influencia sobre la eficiencia de la extracción y en el porcentaje de recuperación de analitos se muestran en el diagrama de Pareto que se muestra en la Figura 1.

Los efectos estimados y su disposición se presentan en orden creciente de importancia. La línea vertical nos indica cuáles efectos son estadísticamente significativos. Cualquier barra que se extienda más allá de esta línea corresponde a efectos que son estadísticamente significativos con un 95,0% de confianza. En este sentido, nueve efectos individuales junto a sus interacciones dobles resultaron ser significativos, es decir tienen un valor de  $p < 0,05$ , indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%. Los signos de cada barra nos indican la proporcionalidad de la variable respuesta con respecto a los factores al aplicar el método de extracción basado en DMFS-AU, es decir un signo positivo indica que el aumento de esta variable resulta en un aumento en la recuperación promedio de BPCs. Un supuesto básico de todo modelo es la evaluación de la existencia de una relación lineal entre las variables. En este modelo se encontró que no había relación lineal entre las variables dependiente y los factores en estudio ( $\alpha=0,05$ ). La evaluación mediante el *test de falta de ajuste* comprueba que el comportamiento de las variables se ajustaba mejor a una relación curvilínea que a un modelo lineal. El modelo de regresión arroja un coeficiente ( $R^2$ ) de 0,89206 (89,206%) lo cual indica una buena respuesta al modelo no lineal con un error residual bajo de 10,79%. La expresión de la ecuación (1) del modelo ajustado en términos de los factores significativos la cual permite conocer los valores óptimos de las variables significativas se muestra a continuación:

$$\% \text{ RA (Y)} = -326,22 + 586,87\mathbf{A} + 13,62\mathbf{B} + 13,87\mathbf{C} - 187,43\mathbf{A}^2 - 10,00\mathbf{AB} - 10,04\mathbf{AC} - 0,12\mathbf{B}^2 - 0,19\mathbf{BC} - 0,11\mathbf{C}^2 \quad (1)$$

donde; **A**= relación muestra: dispersante; **B**=volumen de solvente (C<sub>6</sub>-CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>) y **C**=tiempo de sonificado

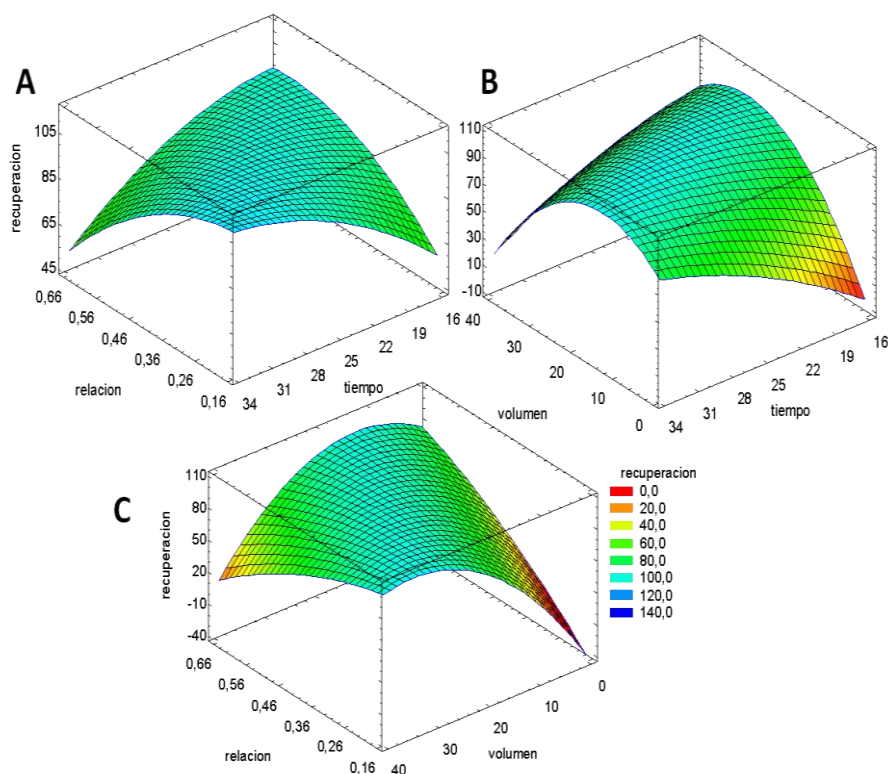


**Fig.1** Grafico de Pareto para efectos principales estandarizado del diseño experimental. La línea vertical indica el nivel de confianza de 95% ( $p=0,05$ ) A: relación muestra: dispersante; B: Volumen de solvente; C: tiempo de sonificado

Los coeficientes positivos (A;B;C) indican que la eficiencia de la extracción aplicando la metodología se favorece con valores altos de estas variables para los niveles estudiados mientras que aquellos coeficientes que son negativos son indicativo que la extracción se favorece con valores bajos de las variables. Coeficientes cuadráticos negativos entre las variables (AB; AC; BC) indican un efecto antagonista, es decir dos variables en conjunto tiene un efecto opuesto disminuyendo la variable respuesta que cuando actúan por separado., la ecuación mostró coeficientes con signos positivos ( $A=relación\ muestra:dispersante$ ;  $B=volumen\ de\ solvente\ (C_6-CH_2CL_2)$  y  $C=tiempo\ de\ sonificación$ ), como negativos ( $A^2$ ;  $B^2$ ;  $C^2$ ; AC; y las interacciones AB;BC;BC).

Los efectos generales de la interacción se muestran en la siguiente figura 2, a partir de una representación 3D del polinomio de la ecuación. (1) obtenida a partir de los datos experimentales ajustados mostrado como un gráfico de superficie de los rendimientos de extracción versus las variables significativas. Como se muestra en la figura 2A, la recuperación de BPCs empleando la metodología de DMFS-AU depende de la relación muestra/dispersante (i.e cantidad de Florisil con respecto a la muestra) y volumen de mezcla de elución (i.e  $C_6-CH_2CL_2$ ), respectivamente. Se observan bajos rendimientos porcentuales (%RA) en ausencia de Florisil o cuando las cantidades de este adsorbente son bajas con respecto a la muestra, es decir relaciones que tiendan a 0,5. De acuerdo al grafico la relación óptima se presenta con un valor de 0,17 en una relación en masa aproximada. g.muestra /g.dispersante de 0,5/3).

La Figura evidencia que altas cantidades de material dispersado en una cantidad fija de muestra se requiere de mayor tiempo de sonificado para la extracción cuantitativa de los BPCs del liofilizado (tiempo: 33min). En la Figura 2B, se relaciona el volumen y el tiempo de sonificado. Bajos volúmenes del solvente extractante disminuye la



**Fig. 2** Curvas de superficie respuesta ajustadas para el diseño de compuesto central  $2^3$  - (A) relación muestra: dispersante: Tiempo de sonicación (B) volumen de  $C_6-CH_2CL_2$  y tiempo de sonicación (C) relación muestra: dispersante

recuperación porcentual. Se encuentra que las mayores recuperaciones de BPCs se presentan con alto volumen de mezcla solvente  $C_6-CH_2CL_2$  en un punto cercano a 23 mL.

Finalmente, la relación entre el volumen de solvente y la cantidad de muestra/absorbente se presentan en la superficie respuesta de la Figura 2C, con volúmenes bajos de solvente la recuperación de analitos disminuye. En general, se observaron altas recuperaciones con altos valores tanto del volumen de  $C_6-CH_2CL_2$  y dispersante.

Las condiciones del modelo optimizadas y ajustadas por el software para la extracción cuantitativa de BPCs empleando DMFS-AU requiere de: una relación de placenta a Florisil de 0,17 empleando un volumen de mezcla de  $C_6-CH_2CL_2$  al 50% de 23,1 mL durante un tiempo de sonicación de 33,40 min.

El procedimiento optimizado se evaluó en muestras reales con tres niveles diferentes de fortificación bajo, medio y alto (25; 50 y 100  $ng\ g^{-1}$ ), respectivamente.

Los resultados obtenidos son consistentes con otros autores [27,31, 38,39]. En cuanto al uso de Florisil como adsorbente de limpieza para la eliminación de lípidos polares. En relación al disolvente, un disolvente orgánico no polar como el hexano resulta mejor para los analitos en estudio, pero carece de la capacidad de penetrar



**Tabla 3.** Datos de merito analítico para la determinación de los Bifenilos policlorados en liofilizado de placenta. (n=3)

BPCs	R	% RECUPERACION (± %DER)			LDD	LDC
		Nivel bajo <sup>(a)</sup> 25 ng g <sup>-1</sup>	Nivel medio <sup>(b)</sup> 50 ng g <sup>-1</sup>	Nivel alto 100 ng g <sup>-1</sup>	(ng g <sup>-1</sup> )	
BPC-1 2-Clorobifenilo	0,9977	96,19±6,58	91,00±6,73	94,08±3,90	0,141	0,470
BPC-5 2,3-Diclorobifenilo	0,9989	90,34±5,01	82,90±3,89	91,16±6,60	0,125	0,417
BPC-29 2,4,5-Triclorobifenilo	0,9968	86,80±2,12	96,95±4,79	94,74±7,12	0,221	0,736
BPC-47 2,2',4,4'-Tetraclorobifenilo	0,9988	98,01±7,98	95,91±8,01	99,90±5,20	0,165	0,552
BPC-98 2,2',3',4,6-Pentaclorobifenilo	0,9985	90,92±2,95	102,64±4,66	91,48±6,28	0,239	0,799
BPC-154 2,2',4,4',5,6'-Hexaclorobifenilo	0,9980	91,03±7,40	90,98±5,40	90,12±5,83	0,221	0,737
BPC-171 2,2',3,3',4,4',6-Heptaclorobifenilo	0,9991	93,21±3,81	97,61±6,18	94,53±4,26	0,059	0,196

profundamente en el tejido [31]. Se observaron extractos más limpios y un rendimiento analítico mejorado al emplear como eluyente la mezcla de C<sub>6</sub>-CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub> (1:1) en la DMFS-AU. Este dispersante ha mostrado ser exitoso en recuperaciones BPCs y pesticidas (mayores a 70%) al aplicarse en la extracción de contaminantes ambientales [40–43].

### 3.2. Parámetros analíticos y validación del método.

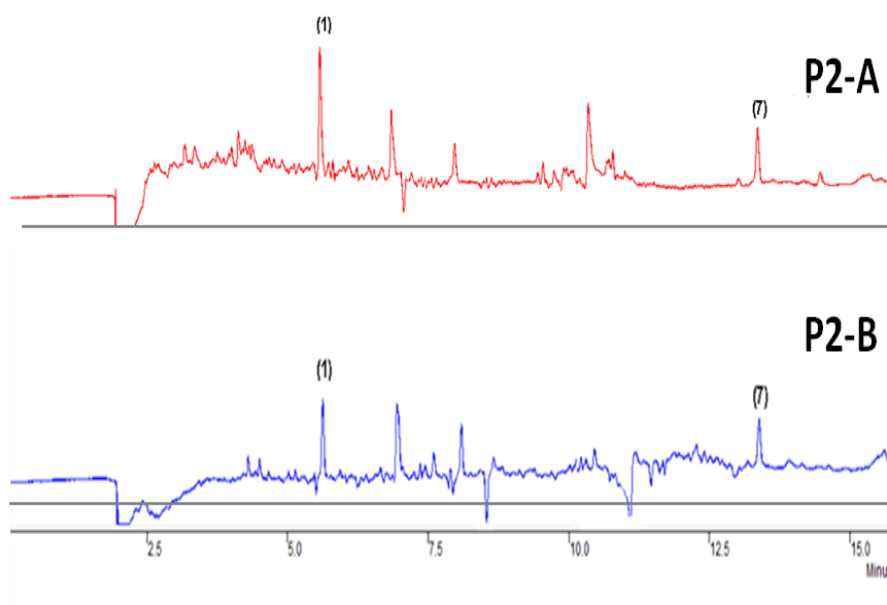
Se estimaron los parámetros de calidad del método con el objetivo de verificar la idoneidad y el rendimiento del método de DMFS-AU para la determinación cuantitativa de los congéneres de BPCs en el tejido placentario (Tabla 3). La linealidad del método se evaluó utilizando muestras de tejido liofilizado en blanco el cual fue fortificado a tres niveles de concentración entre 25 y 100 ng g<sup>-1</sup>. Cada nivel fue evaluado por triplicado y se encontró que la respuesta del detector era lineal en el rango de concentraciones estudiadas con coeficientes de correlación (R) de 0,9968 a 0,9991 para todos los analitos. La precisión del método se evaluó mediante estudios de recuperación calculados según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recuperación analítica} = \frac{[\text{Analito BPCs encontrado}]}{[\text{Analito BPCs patron adicionado}]} \quad (2)$$

De donde la [Analito BPCs encontrado] es la concentración de analito hallada en la muestra fortificada de placenta liofilizada y [Analito BPCs adicionado] es la concentración de analito adicionada de patrón de BPCs.

Las recuperaciones calculadas para cada analito en los diferentes niveles de fortificación 25, 50 y 100 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente fueron superior al 82,9 0% para la mayoría de los compuestos. Los estudios de precisión se se llevaron a cabo en términos de repetibilidad diaria (n = 3) y la reproducibilidad entre días (n = 3), con los niveles de fortificación de 25 y 50 ng g<sup>-1</sup> mediante el cálculo de la desviación estándar relativa (%DER). La repetibilidad intradía, osciló entre 2,12% y 7,98% (Tabla 3), mientras que la reproducibilidad entre días, osciló entre el 3,89% y el 8,01%. Por último, el método analítico demostró ser lo suficientemente sensible para analizar pequeñas cantidades de estos compuestos presente en el tejido placentario.

Los límites de detección (LDDs) así como los límites de cuantificación (LDCs) del método propuesto se evaluaron utilizando GC-ECD en una relación señal-ruido (S/N = 3) y diez (S / N = 10), respectivamente. Los límites de detección y cuantificación oscilaron entre 0,059 a 0,239 ng g<sup>-1</sup> y 0,196 a 0,799 ng g<sup>-1</sup>, para BPCs, respectivamente.



**Fig. 3.** Cromatogramas CG- DCE obtenidos de muestras de placenta aplicando la metodología: (A) DMFS asistida con ultrasonido (B) extracción convencional Soxhlet.

**Tabla 4.** Concentración de BPCs encontrados en tejido placentario de muestras diferentes de placenta obtenidos mediante el método optimizado (DMFS-AU) (n=3).

BPCs	Concentración de congéneres ( ng g <sup>-1</sup> ) ±DER					
	CASO 1 (2,70% lípidos) b	CASO 2 (3,38 % lípidos)	CASO 3 (1,10% lípidos)	CASO 4 (4,12% lípidos)	CASO 5 (3,07% lípidos)	CASO 6 (3,44% lípidos)
<b>BPC-1</b> 2-Clorobifenilo	2,7±3,7	5,1±2,74	nd	nd	3,9±3,7	nd
<b>BPC-5</b> 2,3-Diclorobifenilo	nd <sup>a</sup>	nd	nd	nd	nd	1,9±1,8
<b>BPC-29</b> 2,4,5- Triclorobifenilo	3,9±3,8	nd	nd	nd	4,3±1,9	nd
<b>BPC-47</b> 2,2',4,4'- Tetraclorobifenilo	nd	nd	nd	2,1±2,9	nd	nd
<b>BPC-98</b> 2,2',3',4,6- Pentaclorobifenilo	nd	nd	1,3±2,2	3,3±3,2	2,03±4,9	4,1±2,8
<b>BPC-154</b> 2,2',4,4',5,6'- Hexaclorobifenilo	nd	nd	4,7±1,0	4,1±4,9	1,1± 5,2	3,5±2,8
<b>BPC-171</b> 2,2',3,3',4,4',6- Heptaclorobifenilo	nd	6,1±2,1	2,7±4,1	5,1±2,3	2,7± 4,1	3,2±6,4

a. n d: No detectable (<LDD) b. (% lípidos= g lípido/200 mg de placenta x 100)

Se analizaron seis muestras de placentas separadamente y en duplicado para determinar contenido de residuales de BPCs empleando el método optimizado y compararlo con el método tradicional de Soxhlet. Las concentraciones obtenidas al aplicar la DMFS-AU arrojan resultados que al contrastarse con la extracción tradicional Soxhlet no difieren significativamente a un  $p < 0,05$  a un nivel de confianza de 95%.

Las ventajas encontradas de la DMFS-AU frente a la extracción Soxhlet son múltiples. La reducción del tiempo de extracción de 20 a 24 horas con Soxhlet a solo 33 min. , el bajo consumo de disolvente de 150 mL a 23 mL por cada 0,5 g de muestra del tejido.

Al aplicar la metodología se extrajo menos contenido de lípidos presentando cromatogramas más limpios en la línea base que aquellos extraídos empleando el método Soxhlet (ver cromatograma Figura 3 denotado con letra B) requiriendo una etapa de purificación adicional caso que no requiere cuando se emplea el procedimiento dual de dispersión de matriz en fase solida asistida con ultrasonido.

### 3.3. Aplicación a muestras reales.

La metodología de DMFS-AU optimizada se aplicó con éxito a muestras de placentas. Cada muestra se sometió a los procedimientos de tratamiento y almacenamiento libre de humedad previo al análisis cromatográfico. Se escogieron aleatoriamente 6 casos que fueron analizados por triplicado. Se observa una tendencia a que las concentraciones de congéneres de bifenilos están directamente relacionadas con el contenido de lípidos presentes en la matriz placentaria esto es atribuible a la lipofílicidad de estos compuestos. [7,45].

En la tabla 4, los BPCs 98, 154 y 171 fueron los congéneres con mayor prevalencia. En los casos seleccionados los congéneres de BPCs con alto contenido de cloro (BPCs 98, 154, 171), que carecen de posiciones meta y para no sustituidas son mejores para la bioacumulación y la exposición humana se produce principalmente por la cadena alimenticia. Por lo tanto, la prevalencia de congéneres de BPCs altamente clorados en la mayor parte de los casos de estudio de muestras de tejido placentario humano son indicativo que su principal fuente de contaminación es principalmente por la dieta, sin embargo se presentaron casos donde la presencia de concentraciones de congéneres con bajo contenido de cloro (BPCs 1, 29) es atribuida a exposición directa de la madre[44].

## 4 Conclusiones

Se desarrolló un protocolo analítico de extracción simple, rápida con una buena repetibilidad y reproducibilidad que al combinar en una sola etapa la extracción y la limpieza de lípidos es eficiente para la determinación simultánea de residuos de bifenilos policlorados empleando la CG-DCE, en muestras de placenta humana.

El diseño experimental con base a la Metodología de Superficie Respuesta se empleó para optimizar los parámetros de DMFS-AU para extraer BPCs en tejido de placenta. El diseño estadístico permite reducir de forma considerable el número de experimentos en comparación con los requeridos para un análisis univariado.

La DMFS-AU reduce drásticamente el tiempo de extracción y el consumo de disolvente en comparación con la metodología tradicional Soxhlet al eliminar la necesidad adicional de limpieza.

Este trabajo reporta por vez primera niveles de BPCs en placenta humana en el estado Mérida, Venezuela aun cuando no era objetivo de este trabajo por el tamaño de la muestra. Los resultados de este trabajo serían de gran valor en la evaluación y control de riesgos ante la exposición de compuestos químicos tóxicos lo cual hace atractivo el uso de placenta como marcador de exposición prenatal

## 5 Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por la Universidad de los Andes y el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología y forma parte de la Tesis *Desarrollo y validación de métodos de análisis para determinar pesticidas organoclorados y bifenilos*

*policlorados en placenta humana utilizando cromatografía de gases con detección por captura electrónica*. Los autores desean expresar su agradecimiento Profesor Jorge Uzcategui, Ali Sulbaran pertenecientes al Laboratorio de Físicoquímica Orgánica por su participación en el trabajo y al Dr. Alfredo Usubillaga del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia de la Universidad de los Andes. Mérida – Venezuela

## 5 Referencias

1. Barriada-Pereira M, González -Castro MJ, Muniategui-Lorenzo M, López-Mahía P, Prada-Rodríguez D. Determination of 21 organochlorine pesticides in tree leaves using solid-phase extraction clean-up cartridges. *J Chromatogr A*. 1061(2), pp 133 a 139 (2004)
2. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, disponible en <http://www.pops.int/documents/convtext/context-en.pdf>.
3. Dewan P., Jain V, Gupta P, Banerjee B. Organochlorine pesticide residues in maternal blood cord blood, placenta, and breastmilk and their relation to birth size. *Chemosphere*. 90(5), pp 1704 a1710 (2013)
4. Wang B, Yi D, Lei J, Zhiwen L, Jufen L, Zhang Y, Xinghua Q, Wenxin L, Shu T, Aiguo R. Organochlorine pesticide levels in maternal serum and risk of neural tube defects in offspring in Shanxi Province, China: A case-control study. *Science of the Total Environment*. 490, pp 1037 a 1043 (2014)
5. Bergonzi R, Specchia C, Dinolfo M, Tomasi C, De Palma G, Frusca T, Apostoli P. Distribution of persistent organochlorine pollutants in maternal and foetal tissues: Data from an Italian polluted urban area *Chemosphere*. 76 (6), pp 747 a 754 (2009)
6. López-Espinosa MJ, López-Navarrete E, Rivas A, Fernandez MF, Nogueras M, Campoy C, Olea-Serrano MF, Lardelli P. Organochlorine pesticide exposure in children living in southern Spain. *Environ Res*. 106,(1), pp 1 a 6 (2008)
7. Falcón M, Oliva J, Osuma E, Barba A, Luna A. HCH and DDT residues in human placentas in Murcia (Spain). *Toxicology*. 195, pp 203 a 208 (2004)
8. Park J-S., Bergman A., Linderholm L., Athanasiadou M., Kocan A., Petrik J., Drobna B., Trnovec T., Charles M. J, Picciotto I. H. Placental transfer of polychlorinated biphenyls, their hydroxylated metabolites and pentachlorophenol in pregnant women from eastern Slovakia. *Chemosphere*. (70), pp1676 a 1684 (2008)
9. Shen H, Main K.M, Virtanen HE, Damgaard I N, Haavisto A M., Kaleva M., From mother to child: investigation of prenatal and postnatal exposure to persistent bioaccumulating toxicants using breast milk and placenta biomonitoring. *Chemosphere*. 67(9), pp 256–262 (2007)
10. Myren M, Mose T, Mathiesen L, Knudsen L, The human placenta—an alternative for studying foetal exposure. *Toxicology in Vitro* 21(7), pp 1332 a 1340. (2007)
11. Chao HR, Wang SL, Lin LY, Lee WJ, Pöpke O. Placental transfer of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in Taiwanese

- mothers in relation to menstrual cycle characteristics. *Food and Chemical Toxicology*. 45(2), pp 259 a 265 (2007)
12. Costabeber I, Emanuelli T. Influence of alimentary habits, age and occupation on polychlorinated biphenyl levels in adipose tissue. *Food and Chemical Toxicology* 41(1), pp 73 a 80 (2003)
  13. Freire C., Lopez-Espinosa M.J, Fernández M, Molina-Molina J.M., Prada R, Olea N. Prenatal exposure to organochlorine pesticides and TSH status in newborns from Southern Spain. *Science of the Total Environment* 409(18), pp 3281 a 3287 (2011)
  14. Shen H, Main KM, Virtanen HE, Kaleva M, Virtanen H, Haavisto AM, Skakkebaek NE, Toppari J. Prenatal organochlorines pesticides in placentas from Finland: Exposure of male infants born during 1997-2001. *Placenta* 26, pp 512 a 514 (2005)
  15. Beyer A, Biziuk M. Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food. *Food Chemistry* 108(2), pp 669 a 690 (2008)
  16. Ahmed F. Analysis of polychlorinated biphenyls in food products. *Trends in Analytical Chemistry* 22 (3), pp 170 a 185(2003)
  17. Barker S.A. Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis, *J. Chromatogr. A*. 885 (1-2), pp 115 a 127 (2000)
  18. Barker S.A., Matrix solid phase dispersion (MSPD) Review. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 70, pp 151 a 162 (2007)
  19. Chu X.C., Hu Z.X., Yao H.Y. Determination of 266 pesticide residues in apple juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass selective detection. *Journal of Chromatogr A*. 1063, pp 201 a 210 (2005)
  20. Valenzuela A.I., Lorenzini R., Redondo M.J., Font G., Matrix solid-phase dispersion microextraction and determination by high-performance liquid chromatography with UV detection of pesticide residues in citrus fruit. *J. Chromatogr. A*. 839, pp 101 a 107 (1999)
  21. Sharif Z, Man YB, Hamid NS, Keat CC. Determination of organochlorine and pyrethroid pesticides in fruit and vegetables using solid phase extraction clean-up cartridges. *J. Chromatogr. A* 1127(1-2), 254-261 (2006)
  22. Kubala-Drincic H., Bazulic D., Sapunar-Postruznik J., Grubelic, G. Stuhne M., Matrix solid-phase dispersion extraction and gas chromatographic determination of chloramphenicol in muscle tissue. *J. Agric. Food Chem.* 51 (4), pp 871 a 875 (2003)
  23. Valsamaki, V. I., Boti, V. I., Sakkas, V. A., & Albanis, T. A. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in chicken eggs by matrix solid phase dispersion. *Analytica Chimica Acta*. 573-574, pp 195 a 201 (2006)
  24. Chen , C-L., Tsai E-Y., Ding-Hsie W. Optimisation of matrix solid-phase dispersion for the determination of Dechlorane compounds in marketed fish. *Food Chemistry* 164, pp 286 a 292 (2014)
  25. Cai X., Wang C., Xu J., Xue X., Zhang X., Liang X., Application of matrix solid-phase dispersion methodology to the extraction of endogenous peptides from porcine hypothalamus samples for MS and LC-MS analysis. *J. Chromatogr. B*. 879 (9-10), pp 657 a 661 (2011)

26. Gomes Martins J., Chávez Amaya A., Waliszewski S.M, Colín Cruz A., García Fabila M. M. . Extraction and clean-up methods for organochlorine pesticides determination in milk. *Chemosphere* 92 (3), pp 233 a 246 (2013)
27. Sánchez-Prado L., Lamas J.P., Álvarez-G R. Lores M., García-Jares C., Llompарт M . Determination of suspected fragrance allergens in cosmetics by matrix solid-phase dispersion gas chromatography-mass spectrometry analysis. *J Chromatogr A*. 1218 (31), pp 5055 a 5062 (2011)
28. Negreira N., Rodríguez I , Rubí E , Cela R. Determination of selected UV filters in indoor dust by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1216 (31), pp 5895 a 5902 (2009)
29. Barfi B, Asghari A, M Rajabi, barfi A, Saeidi I. Simplified miniaturized ultrasound-assisted matrix solid phase dispersion extraction and high performance liquid chromatographic determination of seven flavonoids in citrus fruit juice and human fluid samples: hesperetin and naringenin as biomarkers. *J Chromatogr A* 1311, pp 30 a 40 (2013)
30. Sonneborn D, Parque HY, Babinska K, L Palkovičova, Trnovec T, Kocan A, Nguyen DV, Hertz-Picciotto I. Serum PCB concentrations in relation to locally produced food items in eastern Slovakia. *J Expo Sci Environ Epidemiol* . 18 (6), pp 581 a 587 (2008)
31. Dassanayake Priyanthi R. M. A., Hua Wei, Rachel C. Chen An Li. Optimization of the Matrix Solid Phase Dispersion extraction procedure for the Analysis of Polybrominated Diphenyl Ethers in Human Placenta. *Analytical Chemistry* 81 (23), pp 9795 a 9801 (2009)
32. Ozcan S, Tor A, Aydin M. Application of miniaturised ultrasonic extraction to the analysis of organochlorines pesticides in soil . *Analytica Chimica Acta* 640, pp 52 a 57 (2009)
33. Priego-Capote F., Luque de Castro M.D. Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 23( 9), pp 644 a 653 (2004)
34. Ramos J.J., Rial-Otero R., Ramos L., Capelo J.L. Ultrasonic-assisted matrix solid-phase dispersion as an improved methodology for the determination of pesticides in fruits. *Short communication.. Journal of Chromatography A* 1212, pp 145 a 149 (2008)
35. Norma Oficial Mexicana. NOM-021-ZOO-1995. Análisis de residuos de plaguicidas organoclorados y bifenilos policlorados en grasa de bovinos, equinos, porcinos, ovinos y aves por Cromatografía de Gases.
36. Montgomery D.C. Diseño y análisis de experimentos. 2da. ed. Mexico, Editorial Limusa Wiley ( 2004)
37. Gutiérrez Pulido H., De la Vara Salazar R. Análisis y diseño de experimentos, 2da ed. México: Mc Graw Hill Interamericana ( 2003)
38. Moliner-Martínez Y., Campíns-Falcó P., Molins-Legua C., Segovia-Martínez L., Seco-Torrecillas A. Miniaturized matrix solid phase dispersion procedure and solid phase microextraction for the analysis of organochlorinated pesticides and polybrominated diphenylethers in biota samples by gas chromatography electron capture detection. *J Chromatogr A*. 2009; 1216 (39): 6741-5.
39. Fernandez-Alvarez M., Llompарт M., Lamas J.P., Lores M., Garcia-Jares C., Cela R., Dagnac T. Development of a matrix solid-phase dispersion method for

- the simultaneous determination of pyrethroid and organochlorinated pesticides in cattle feed. *J Chromatogr A*. 1216(14), pp 2832 a 2842 (2009)
40. Li Z.Y, Zhang ZC., Zhou Q.L, Wang Q.M, Gao R.Y, Wang Q.S Stereo- and enantioselective determination of pesticides in soil by using achiral and chiral liquid chromatography in combination with matrix solid-phase dispersion. *J AOAC Int*. 86(3), pp 521 a 528 (2003)
  41. Gómez-Ariza J.L.,Bujalance M.,Giráldez I.,VelascoA.,Morales E. Determination of polychlorinated biphenyls in biota samples using simultaneous pressurized liquid extraction and purification. *J Chromatogr A*. 946(1-2), pp 209 a 19 (2002)
  42. Morzycka B., Simple method for the determination of trace levels of pesticides in honeybees using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 982(2), pp 267 a 273 (2002)
  43. Albero B., Sánchez-Brunete C, Tadeo JL.Determination of organophosphorus pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *J Agric Food Chem* 51(24), pp 6915 6921 (2003)
  44. Chu S., Covaci A., Schepens P. Levels and chiral signatures of persistent organochlorine pollutants in human tissues from Belgium. *Environ Res*. 93(2), pp 167 a 176 (2003)
  45. Waliszewski SM, Aguirre A, Infanzón RM, Siliceo J. Carry-over of persistent organochlorine pesticides through placenta to fetus. *Salud Pública de México* 42(5), pp 384 a 390 (2000)