

**APLICACIÓN DE SISTEMAS DE EXTRACCIÓN
SIN DISOLVENTES PARA LA DETERMINACIÓN
DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN
MATERIAL DE INTERÉS MÉDICO-LEGAL**



MARÍA EUGENIA GALLARDO ALBA

Santiago de Compostela, 2005

ÍNDICE GENERAL

Capítulo I.	11
Introducción: Aspectos generales de los Pesticidas Organofosforados	
Capítulo II.	51
Revisión bibliográfica	
Capítulo III.	81
Microextracción en Fase Sólida (SPME)	
Capítulo IV.	105
Justificación y Objetivos	
Capítulo V.	109
Parte Experimental: Determinación de pesticidas organofosforados en sangre y orina	
Capítulo VI.	173
Discusión	
Capítulo VII.	185
Conclusiones	
Anexos	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura química de la acetilcolina.	28
Figura 2: Mecanismo de acción de las colinesterasas.	29
Figura 3: Inhibición de las colinesterasas en presencia de pesticidas organofosforados.	29
Figura 4: Proceso de biotransformación de los organofosforados en mamíferos.	32
Figura 5: Intoxicaciones por pesticidas organofosforados entre 1998 y 2005.	46
Figura 6: Soporte manual de SPME e detalle de una fibra.	84
Figura 7: Etapas do processo de microextração em fase sólida.	85
Figura 8: Modos de extração.	90
Figura 9: Cromatograma, estructura y espectro de masas de la molécula de dimetoato.	118
Figura 10: Cromatograma, estructura y espectro de masas de la molécula de diazinón.	118
Figura 11: Cromatograma, estructura y espectro de masas de la molécula de paraoxon.	118
Figura 12: Cromatograma, estructura y espectro de masas de la molécula de paratión.	119
Figura 13: Cromatograma, estructura y espectro de masas de la molécula de clorpirifos.	119
Figura 14: Cromatograma, estructura y espectro de masas de la molécula de quinalfos.	119
Figura 15: Cromatograma, estructura y espectro de masas de la molécula de clorfenvinfos.	120

Figura 16: Cromatograma, estructura y espectro de masas de la molécula de etión.	120
Figura 17: Cromatograma, estructura y espectro de masas de la molécula de azinfos metil.	120
Figura 18: Cromatogramas en modo SIM de los iones utilizados para la cuantificación de cada uno de los ocho pesticidas (1 µg), incluyendo el patrón interno.	122
Figura 19: Cromatogramas en modo SIM de los iones utilizados para la cuantificación de cada uno de los ocho pesticidas (1 µg), incluyendo el patrón interno.	122
Figura 20: Esquema de los procedimientos de extracción.	124
Figura 21: Superposición de los cromatogramas obtenidos con cada una de las fibras en una muestra de orina que contiene 1 µg/mL de cada uno de los pesticidas.	125-126
Figura 22: Superposición de los cromatogramas obtenidos con cada una de las fibras en una muestra de sangre que contiene 1 µg/mL de cada uno de los pesticidas.	127
Figura 23: Influencia del volumen de orina sobre la cantidad extraída de pesticida (áreas).	129
Figura 24: Extracción de 1 µg de dimetoato y etión tras precipitación de proteínas con ácido perclórico.	130
Figura 25: Extracción de 1 µg de dimetoato y etión sin precipitación de proteínas.	130
Figura 26: Cantidad extraída de cada analito en sangre frente al tiempo de extracción.	131
Figura 27: Cantidad extraída de cada analito en orina frente al tiempo de extracción.	131
Figura 28: Influencia de la temperatura sobre la cantidad de analito extraída en sangre.	134

Figura 29: Influencia de la temperatura sobre la cantidad de analito extraída en orina.	134
Figura 30: Superposición de los cromatogramas obtenidos con y sin agitación durante la extracción de 2,5 µg de dimetoato en sangre.	135
Figura 31: Superposición de los cromatogramas obtenidos con y sin agitación durante la extracción de 2,5 µg de dimetoato en orina.	135
Figura 32: Efecto del pH sobre la cantidad de pesticida extraída (áreas) en sangre.	136
Figura 33: Efecto del pH sobre la cantidad de pesticida extraída (áreas) en orina.	137
Figura 34: Influencia de la fuerza iónica sobre la cantidad de pesticida extraída en sangre.	138
Figura 35: Influencia de la fuerza iónica sobre la cantidad de pesticida extraída en orina.	138
Figuras 36-44: Superposición de cromatogramas (iones cuantificadores) de muestras a las que se añadieron diferentes concentraciones de cada pesticida con muestras blanco.	141-144

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Fórmulas estructurales y características fisicoquímicas de algunos pesticidas organofosforados.	17
Tabla 2: Solicitudes de rastreo de pesticidas efectuadas a la Delegación de Coimbra del INML y casos positivos entre 2000 y 2005.	45
Tabla 3: Características dos diferentes tipos de fibras disponíveis no mercado	84
Tabla 4: Descripción de los iones seleccionados y tiempos de retención para cada uno de los pesticidas de estudio.	121
Tabla 5: Resultados de la validación de la linealidad del quinalfos siguiendo el método empleado.	147
Tabla 6: Resultados de la validación de la linealidad del paratión siguiendo el método empleado.	148
Tabla 7: Resultados de la validación de la linealidad del dimetoato siguiendo el método empleado.	149
Tabla 8: Resultados del estudio de la precisión intradía y exactitud del quinalfos.	151
Tabla 9: Resultados del estudio de la precisión intradía y exactitud del paratión.	152
Tabla 10: Resultados del estudio de la precisión intradía y exactitud del dimetoato.	152
Tabla 11: Resultados del estudio de la precisión interdía y exactitud del quinalfos.	153
Tabla 12: Resultados del estudio de la precisión interdía y exactitud del paratión.	153
Tabla 13: Resultados del estudio de la precisión interdía y exactitud del dimetoato.	154
Tabla 14: Resultados de los LODs y LLOQ de los ocho pesticidas de estudio.	155
Tabla 15: Estudio de la recuperación de quinalfos en sangre y orina.	157
Tabla 16: Estudio de la recuperación de paratión en sangre y orina.	157
Tabla 17: Estudio de la recuperación de dimetoato en sangre y orina.	158
Tabla 18: Factores de dilución de la muestra analizados.	159

ABREVIATURAS

ACE	Acetilcolinesterasa
Ach	Acetilcolina
AEPLA	Asociación Empresarial para la Protección de Plantas
BuCE	Pseudocolinesterasa
CAR/PDMS	Carboxen/Polidimetilsiloxano
CLP	Clorpirifos
CV	Coeficiente de Variación
CW/DVB	Carbowax/Divinilbenceno
CW/TPR	Carbowax/Templated Resin
DGPC	Direcção-Geral de Protecção das Culturas
DI-SPME	Microextracción en Fase Sólida-Inmersión Directa
DMFS	Dispersión de la Matriz en Fase Sólida
DVB/CAR/PDMS	Divinilbenceno/Carboxen/Polidimetilsiloxano
ECPA	European Crop Protection Association
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FAO	Food and Agricultural Organization
FDA	Food and Drug Administration
GC	Cromatógrafo de Gases
GC/ECD	Cromatografía de Gases/Detector de Captura de Electrones
GC/FID	Cromatografía de Gases/Detector de Ionización de Llama
GC/FPD	Cromatografía de Gases/Detector Fotométrico de Llama
GC/FTD	Cromatografía de Gases/Detector Termiónico de Llama
GC/MS	Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas
GC/NPD	Cromatografía de Gases/Detector de Nitrógeno y Fósforo
GC/TSD	Cromatografía de Gases/Detector Termiónico Específico
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HS-SPME	Microextracción en Fase Sólida-Headspace

ICH	International Conference on Harmonization
INML	Instituto Nacional de Medicina Legal
LC/MS	Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masas
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
LLE	Extracción Líquido/Líquido
LMR	Límite Máximo de Resíduos
LOD	Límite de Detección
LLOQ	Límite Inferior de Cuantificación
NTE	Esterasa Neuropática
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Poliacrilato
PAHs	Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos
PCBs	Bifenilos Policlorados
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS/DVB	Polidimetilsioxano/Divinilbenceno
PI	Patrón Interno
POF	Pesticidas Organofosforados
SD	Desviación Estándar
SGSASL	Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral
SIM	Selective Ion Monitoring
SNC	Sistema Nervioso Central
SPE	Extracción en Fase Sólida
SPME	Microextracción en Fase Sólida
STF-DC-INML	Servicio de Toxicología Forense de la Delegación de Coimbra del Instituto Nacional de Medicina Legal
UE	Unión Europea
VOCs	Compuestos Orgánicos Volátiles

CAPÍTULO I

ASPECTOS GENERALES DE LOS PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN: ASPECTOS GENERALES DE LOS PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

1. Introducción	13
2. Estructura y propiedades fisicoquímicas	15
3. Aplicaciones, datos de comercialización y normativas de uso	18
3.1. Aplicaciones	18
3.2. Datos de comercialización en España	20
3.3. Datos de comercialización en Portugal	20
3.4. Normativas de uso	21
3.4.1. Situación legal en España	22
3.4.2. Situación legal en Portugal	24
4. Mecanismo de acción	27
5. Toxicocinética	30
6. Dosis tóxicas	33
7. Manifestaciones clínicas	34
Intoxicación aguda	36
Intoxicación crónica	37
Neurotoxicidad retardada	38
8. Diagnóstico	39
9. Tratamiento	41
10. Etiología de las intoxicaciones	42
11. Epidemiología de las intoxicaciones	43
Casuística en España	43
Casuística en Portugal	44
Referencias Bibliográficas	47

1. INTRODUCCIÓN

Los pesticidas constituyen un amplio y heterogéneo grupo de agentes químicos, físicos y biológicos destinados a la destrucción de organismos vivos indeseables. Aunque el término pesticida es el más ampliamente utilizado para referirse a este tipo de sustancias, denominaciones como plaguicida o biocida son también aceptadas con este fin.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Food and Agricultural Organization (FAO) definen los *plaguicidas* como «*cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicios o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a ser usadas como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o para evitar su caída prematura, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte*» [1].

La utilización de pesticidas no constituye una práctica reciente, sino que a lo largo de la historia diversos compuestos han sido empleados para controlar los organismos que constantemente amenazaban las reservas alimentarias o la salud pública. Probablemente fueron los egipcios (1550 a.C.) los primeros en utilizar pesticidas, compuestos químicos inespecíficos, para eliminar las pulgas de sus casas. Compuestos como el azufre fueron utilizados por los chinos como fumigantes antes del año 1000 a.C., mientras que los japoneses en el siglo XVI

empleaban una mezcla de vinagre y aceite de ballena para prevenir el desarrollo de larvas en los campos de arroz.

Durante los siglos XVII y XIX, y con los mismos fines, se utilizaron numerosas sustancias como extractos acuosos de hojas de tabaco pulverizadas, *Strychnos nux-vomica*, compuestos arsenicales, rotenona o *pyretrum* (precursor de las piretrinas).

No obstante, fue el rápido desarrollo de la industria agro-química, iniciado tras la II Guerra Mundial, el factor que propició la aparición en el mercado de una gran variedad de herbicidas, insecticidas y otros agentes químicos [2].

Los pesticidas pueden ser clasificados según la dosis letal (ver apartado 6), el uso al que estén destinados (insecticidas, herbicidas, rodenticidas o fungicidas) y su estructura química. En este trabajo hemos adoptado esta última clasificación, siguiendo las directrices de la OMS:

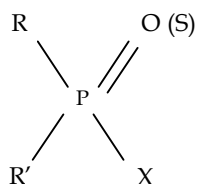
- Organoclorados
- Organofosforados
- Carbamatos
- Piretróides
- Derivados bupiridílicos
- Clorofenoxiácidos
- Cloronitrofenoles y organomercuriales
- Compuestos orgánicos del estaño
- Tiocarbamatos
- Ditiocarbamatos
- Otros: fumigantes (bromuro de metilo, fosfatina, ácido cianhídrico), rodenticidas (sulfato de talio, fluoracetato sódico, warfarina) e insecticidas inorgánicos (arsenito sódico, criolita).

De todos ellos, los organofosforados son los pesticidas más ampliamente utilizados en la agricultura mundial [3], reemplazando casi por completo a los compuestos organoclorados, debido, principalmente, a su escasa persistencia en el medio ambiente y a su mayor efectividad [4, 5].

El primero componente de este grupo fue el tetraetil-pirofosfato (TEPP), descubierto en 1854 por Clemont [6, 7] y ampliamente utilizado por los alemanes durante la II Guerra Mundial debido a sus propiedades tóxicas no sólo sobre los insectos sino también sobre el ser humano [5]. Aprovechando esta última acción, la industria bélica se encargó de sintetizar numerosos compuestos, como los denominados “gases nerviosos”, entre los que se encuentran el sarín, tabún y somán [8]. Desde 1945 se han sintetizado más de 40.000 compuestos, de los cuales unos 50 son los más empleados habitualmente [4].

2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

Todos ellos derivan de la molécula del ácido fosfórico (P=O) o fosforotióico (P=S) [2], y en general poseen la siguiente fórmula estructural:



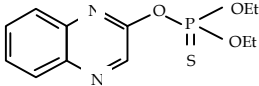
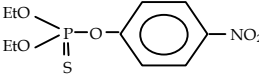
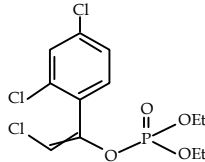
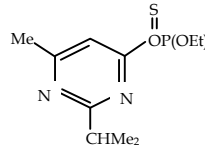
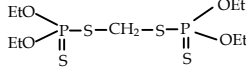
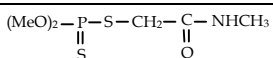
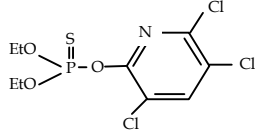
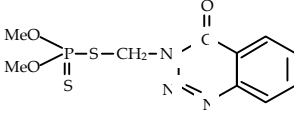
Los radicales R y R' pueden ser grupos alquilo, alcoxi, ariloxi, amido u otros y X puede ser un grupo haluro, fenoxi, tiofenoxi, fosfato, carboxilato, etc. [3, 4, 9].

En general, se trata de compuestos líquidos y marcadamente apolares, lo que significa que desde el punto de vista químico la mayoría son escasamente solubles en agua, aunque con grandes diferencias de un compuesto a otro, y

desde el punto de vista biológico tienden a disolverse en grasas [6]. Por tal motivo, la piel, debido a su elevado contenido lipídico, puede constituir una importante vía de entrada.

Muchos de estos compuestos se evaporan a temperatura ambiente y, en cuanto a su estabilidad, ésta depende del pH del medio donde se encuentren; a pH fuertemente alcalino o en la presencia de humedad se descomponen, lo que puede ser utilizado para su destrucción [7, 10]. En la Tabla 1 se recogen las características fisicoquímicas más importantes de algunos pesticidas organofosforados.

Tabla 1. Fórmulas estructurales y características fisicoquímicas de algunos pesticidas organofosforados (K_{ow} : coeficientes de partición n-octanol-agua) [11].

COMPUESTO	ESTRUCTURA QUÍMICA	PESO MOLECULAR	SOLUBILIDAD EN AGUA (mg/mL)	Log K_{ow}^a
Quinalfos		298,3	-	-
Etil paratión		291,3	24	3,76
Clorfenvinfos		359,6	-	3,55
Diazinón		304,3	40	3,30
Etión		384,5	1	5,07
Dimetoato		229,2	25	0,69
Clorpirifos		350,6	0,0013	5,13
Azinfos metil		317,0	0,03	2,69

3. APLICACIONES, DATOS DE COMERCIALIZACIÓN Y NORMATIVAS DE USO

3.1. APLICACIONES

El principal fin al que se destinan los pesticidas es, como la propia palabra indica, el control de plagas, y más concretamente el control de insectos, de aquí que también se les denomine *insecticidas organofosforados*. No sólo son utilizados en la agricultura, sino que también se emplean en la industria, en fumigaciones en locales de trabajo, en jardines, en el control de poblaciones de animales y en la práctica veterinaria.

De forma resumida, vamos a destacar únicamente las aplicaciones de aquellos que han sido objeto de nuestro estudio.

- DIMETOATO: Es un acaricida e insecticida sistémico que también actúa por contacto e ingestión, y que se utiliza para el control de un amplio grupo de insectos en cereales, cítricos, café, algodón, olivos, patatas, té, tabaco y vegetales. También es utilizado para el control de moscas en establos y corrales.
- PARATIÓN: Es un insecticida y acaricida no sistémico que actúa por contacto, por ingestión y a nivel respiratorio. Se utiliza para el control de varios tipos de insectos en cereales, frutas (incluyendo cítricos), viñas, vegetales, plantas ornamentales y algodón.
- DIAZINÓN: Es un insecticida y acaricida no sistémico que actúa por contacto, por ingestión y a nivel respiratorio. Es uno de los organofosforados con mayor campo de aplicaciones. Se utiliza para el

control de varios tipos de insectos en árboles frutales, vegetales, patatas, caña de azúcar, café, cacao, té, tabaco, maíz, alfalfa, arroz, plantas ornamentales, etc. También es utilizado en veterinaria, principalmente como ectoparasiticida.

- CLORPIRIFOS: Es un insecticida no sistémico que actúa por contacto, por ingestión y a nivel respiratorio. Es ampliamente utilizado en viviendas y en agricultura, para el control de varias especies de insectos que atacan las cosechas de cítricos, frutos secos, fresas, higos, patatas, tabaco, semillas de soja, girasoles, setas, arroz, algodón, alfalfa, maíz, etc. También es utilizado en el control de insectos domésticos (*Blattellidae*, *muscidae* e *isoptera*), mosquitos (lavas y adultos) y en establos.
- CLORFENVINFOS: Es un insecticida y acaricida que tiene una gran actividad residual. Es utilizado para el control de varios tipos de insectos en el maíz, trigo, arroz, cítricos, caña de azúcar etc. También se utiliza en salud pública para el control de larvas de mosquito y como ectoparasiticida en animales.
- QUINALFOS: Es un insecticida y acaricida, que también actúa por contacto e ingestión. Se utiliza para el control de varias especies de insectos en árboles frutales, algodón, remolacha azucarera, vegetales, arroz, y cacahuetes, entre otros.
- AZINFOS METIL: Es un insecticida no sistémico que actúa por contacto y por ingestión. Se utiliza para el control de varios tipos de insectos en árboles frutales, frutos secos, fresas, patatas, maíz, algodón, café, etc. [12].

3.2. DATOS DE COMERCIALIZACIÓN EN ESPAÑA

Según datos de la Asociación Empresarial para la Protección de Plantas (AEPLA) y de la European Crop Protection Association (ECPA), en 1997 España era el quinto país de la UE en cuanto al consumo de productos fitosanitarios, con un 9,3% [10]. La evolución del mercado español sobre el consumo de plaguicidas desde 1997 hasta 2004 ha ido aumentando, alcanzándose un máximo en 2001 (110.946 toneladas). Respecto a las Comunidades Autónomas con mayor mercado de productos fitosanitarios en 2003 fueron Andalucía (33,3%), Comunidad Valenciana (14,5%), Comunidad Murciana (10,14%) y Cataluña (8,49%) [13].

En el momento actual los únicos pesticidas comercializados, dentro del grupo de pesticidas por nosotros estudiado, y según el listado del Ministerio de Sanidad y Consumo [14], son el clorpirifos y el diazinón. Concretamente existen 186 productos comercializados que contienen clorpirifos sólo y en asociación, principalmente con piretrinas (tetrametrina, butóxido de piperonilo, cipermetrina, etc.) y carbamatos (bendiocarb, propoxur, metomilo, entre otros), y 33 productos que contienen diazinón también sólo y en asociación con otros pesticidas, principalmente piretrinas.

3.3. DATOS DE COMERCIALIZACIÓN EN PORTUGAL

Centrándonos en los pesticidas que hemos estudiado, el paratión y el quinalfos son los únicos que ya no están comercializados en Portugal, el primero desde 1995 y el quinalfos desde 2003 [15, 16]. No obstante, como se puede constatar en la casuística del Servicio de Toxicología Forense de la Delegación de Coimbra del Instituto Nacional de Medicina Legal (STF-DC-INML), son precisamente estos dos pesticidas organofosforados los que causan más intoxicaciones en Portugal,

probablemente debido a que en zonas rurales continúan existiendo pequeños almacenes.

Con respecto a los restantes pesticidas, existen varias formulaciones en el mercado, algunas de ellas constituidas por más de un principio activo. Así, existen 3 formulaciones que contienen azinfos metil, 20 que contienen clorpirifos sólo o en asociación con cipermetrina, deltametrina, dimetoato y hexaflumurano. Existen 2 productos que contienen clorfenvinfos y 5 que contienen diazinón. El dimetoato, además de la asociación con el clorpirifos, aparece en el mercado en 11 productos más [17].

3.4. NORMATIVAS DE USO

En cuanto a las normativas de uso, no existe una legislación común que controle este tipo de productos, sino que cada país tiene sus propias normativas. Así, existen pesticidas cuya venta está autorizada en unos países y en otros no. Este es, por ejemplo, el caso del paratión, cuya comercialización está prohibida en casi todos los países incluyendo España y Portugal, pero que en países como Colombia continúa permitiéndose su uso, aunque únicamente en el cultivo de algodón.

En el ámbito de la Unión Europea (UE) la política de prevención y control de los productos químicos está coordinada por las directivas y reglamentos que regulan las sustancias y preparados químicos peligrosos. Son cuatro los instrumentos jurídicos básicos y de carácter horizontal que regulan los productos químicos en la UE:

- **Directiva 67/548/CEE** del Consejo sobre aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados

Miembros relativas a la clasificación, envasado y etiquetado de las sustancias peligrosas.

- **Directiva 1999/45/CE** del Consejo, sobre la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros relativas a la clasificación, envasado y etiquetado de preparados peligrosos.
- **Reglamento (CEE) n° 793/93** del Consejo, sobre evaluación y control del riesgo de sustancias existentes.
- **Directiva 76/769/CEE** relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos.

3.4.1. SITUACIÓN LEGAL EN ESPAÑA

España mantiene un registro para la autorización de plaguicidas no agrícolas desde 1983. La Ley General de Sanidad establece que las autoridades sanitarias propondrán o participarán con otros Departamentos en la elaboración y ejecución de la legislación sobre sustancias tóxicas y peligrosas, así como en la determinación de los requisitos técnicos y condiciones mínimas en materia de vigilancia y control sanitario de las mismas. Concretamente es la Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral (SGSASL) del Ministerio de Sanidad y Consumo la unidad competente para la aplicación y la transposición de la legislación europea sobre el control de productos químicos en todos los aspectos relacionados con la salud. Además, es la responsable, entre otras funciones, del registro de plaguicidas de usos en salud pública, del sistema de notificación de sustancias nuevas, de la evaluación del riesgo de sustancias existentes, de la directiva de limitaciones, de la exportación e importación de

sustancias y productos químicos peligrosos, de la clasificación y etiquetado de sustancias y preparados químicos peligrosos, de la evaluación de la peligrosidad-toxicidad de los productos fitosanitarios, zoonosanitarios y fertilizantes, y de la homologación de productos para el tratamiento de piscinas. La legislación Española que regula los biocidas se fundamenta en las directivas europeas y su transposición para nuestro país. A continuación aparecen resumidas las principales disposiciones vigentes en nuestro país [18, 19]:

ÁMBITO	LEGISLACIÓN
Reglamentación Técnico-Sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas.	Real Decreto 3349/1983 , de 30 de noviembre, (B.O.E. de 24 de enero de 1984).
Se modifica la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de los plaguicidas.	Real Decreto 162/1991 , de 8 de febrero, (B.O.E. de 15 de febrero de 1991).
Se normalizan la inscripción y funcionamiento del Registro de Establecimientos y Servicios Plaguicidas.	Orden de 24 de febrero de 1993 , (B.O.E. de 4 de marzo de 1993).
Se prohíbe la comercialización y utilización de plaguicidas de uso ambiental que contienen determinados ingredientes activos peligrosos.	Orden de 4 de febrero de 1994 , (B.O.E. de 17 de febrero de 1994).
Se establece la normativa reguladora de la homologación de cursos de capacitación para realizar tratamientos con plaguicidas.	Orden de 8 de marzo de 1994 , (B.O.E. de 15 de marzo de 1994).
Se modifica la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la fabricación,	Real Decreto 443/1994 , de 11 de marzo, (B.O.E. de 30 de marzo de 1994).

comercialización y utilización de los plaguicidas.	(B.O.E. de 30 de marzo de 1994).
Comercialización de Biocidas en el ámbito europeo, estableciendo principios comunes de evaluación y autorización de biocidas evitando, de esta forma barreras económicas/administrativas.	Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de febrero de 1998, (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, DOCE serie L nº 123 de 24 de abril de 1998).
Relativo a la primera fase del programa contemplado en el apartado 2 del artículo 16 de la Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre Biocidas.	Reglamento CE N° 1896/2000 de la Comisión de 7 de septiembre de 2000, (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, DOCE serie L nº 228 de 8 de septiembre de 2000).
Transposición de la Directiva 98/8/CE a nuestro ordenamiento jurídico, por el que se regula el proceso de evaluación para el registro, autorización y comercialización de biocidas.	Real Decreto 1054/2002 , de 11 de octubre, (BOE de 15 de octubre de 2002).
Relativo a la segunda fase del programa de trabajo de diez años contemplado en el apartado 2 del artículo 16 de la Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a la comercialización de biocidas y por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 1896/2000.	Reglamento CE N° 2032/2003 de la Comisión de 4 de noviembre de 2003, (Diario Oficial de la Unión Europea, DOCE serie L nº 307 de 24 de noviembre de 2003).

3.4.2. SITUACIÓN LEGAL EN PORTUGAL

En Portugal, la introducción de productos fitosanitarios en el mercado, tal y como sucede en el resto de los países miembros de la Unión Europea (UE), es precedida de una evaluación técnico-científica de esos productos, incluyendo una evaluación del riesgo para el hombre, como usuario, para los animales y para el ambiente. Esta evaluación tiene como objetivo garantizar que estos productos no provocan efectos perjudiciales para la salud del hombre ni de los animales cuando son utilizados adecuadamente y que además no alteran el equilibrio de los ecosistemas sobre los que se aplican.

Los productos autorizados y las condiciones de utilización son controlados por un sistema de homologación regulado por el *Decreto-Lei nº 94/98 de 15 de Abril*, bajo el cual se realizan las solicitudes de autorización y venta, entre otras cuestiones.

La *Direcção-Geral de Protecção das Culturas (DGPC)* es la entidad responsable de la evaluación de autorizaciones y la que aprueba la colocación en el mercado y la utilización de estos después de evaluar los riesgos que entrañan para el hombre, los animales y el medio ambiente. Esta entidad también se encarga, utilizando criterios establecidos por la FAO/OMS y por la Comisión Europea, de evaluar los niveles de residuos en los alimentos (*Limite máximo de residuos-LMR*), que, en Portugal, tienen una legislación propia.

Portugal realiza anualmente un programa nacional de control de residuos, contribuyendo conjuntamente con otros países de la UE para el programa comunitario. Estos programas tienen como objetivo la verificación y conformidad de los residuos encontrados en los productos agrícolas con los LMR establecidos. A continuación aparece de forma resumida la legislación más importante sobre el control de estos productos en Portugal [20]:

ÁMBITO	LEGISLACIÓN
INTRODUCCIÓN EN EL MERCADO	<p>DL 284/94 de 11 de noviembre, alterado por el DL 131/97 de 30 de mayo;</p> <p>DL 94/98 de 15 de abril, alterado por los DL 341/98, 22/2001, 238/2001, 28/2002, 101/2002, 160/2002, 198/2002, 72-H/2003 y 215/2003, respectivamente de 4 de noviembre, 30 de enero, 30 de agosto, 14 de febrero, 12 de abril, 9 de julio, 25 de septiembre, 14 de abril y 18 de agosto.</p>
CLASIFICACIÓN, RÓTULOS Y EMBALAJES	<p>DL 294/88 de 24 de agosto, alterado por los DL 303/91, 385/93 e 137/97, respectivamente de 16 agosto, 18 de noviembre y 30 de mayo</p> <p>DL 82/2003 de 23 de abril</p>
LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS (LMR)	<p>Base/LMR:</p> <p>DL 144/2003 de 2 de julio</p> <p>LMR:</p> <p>P 488/90 de 29 de junio</p> <p>P 491/90 de 30 de junio</p> <p>P 492/90 de 30 de junio</p> <p>P 360/93 de 30 de marzo</p> <p>P 48/94 de 18 de enero</p> <p>P 127/94 de 1 de marzo</p> <p>P 625/96 de 4 de noviembre</p> <p>P 649/96 de 12 de noviembre</p>

	<p>P 49/97 de 18 de enero</p> <p>P 102/97 de 14 de febrero</p> <p>P 1101/99 de 21 de diciembre</p> <p>DL 27/2000 de 3 de marzo</p> <p>P 1077/2000 de 8 de noviembre</p> <p>DL 21/2001 de 30 de enero</p> <p>DL 215/2001 de 2 de agosto</p> <p>DL 256/2001 de 22 de septiembre</p> <p>DL 31/2002 de 19 de febrero</p> <p>DL 245/2002 de 8 de noviembre</p> <p>DL 68/2003 de 8 de abril</p> <p>DL 156/2003 de 18 de julio</p> <p>DL 300/2003 de 4 de diciembre</p>
--	---

DL (Decreto-Lei); P (Portaria).

4. MECANISMO DE ACCIÓN

El principal mecanismo de acción de los pesticidas organofosforados es la inhibición de las enzimas responsables de la degradación de la acetilcolina a nivel sináptico.

La acetilcolina (Ach, Figura 1) es un neurotransmisor que media la transmisión fisiológica de los impulsos nerviosos de [7]:

- las neuronas pre y postganglionares de los sistemas nerviosos simpático y parasimpático
- las fibras postganglionares parasimpáticas hacia los órganos efectores
- las fibras postganglionares simpáticas hacia las glándulas sudoríparas
- los nervios motores hacia el músculo esquelético
- y de algunos terminales nerviosos en el Sistema Nervioso Central (SNC).

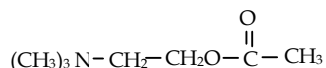


Figura 1. Estructura química de la acetilcolina.

Una vez liberada al espacio intersináptico, interactúa con sus receptores para ejercer las acciones específicas en cada órgano, siendo degradada inmediatamente por las acetilcolinesterasas (Figura 2).

En el organismo existen dos tipos de colinesterasas [10, 21]:

- Acetilcolinesterasa (ACE), colinesterasa verdadera, eritrocitaria o específica, que tiene una afinidad casi específica para la acetilcolina. Se encuentra localizada en el tejido nervioso, en la unión neuromuscular y en los eritrocitos. Esta enzima es la más perjudicada por la acción de los organofosforados.

- Pseudocolinesterasa o colinesterasa inespecífica, también denominada butirilcolinesterasa (BuCE), que tiene capacidad para hidrolizar cierta cantidad de ésteres sintéticos y naturales, entre los que se encuentra la acetilcolina. Existen varias isoenzimas de la pseudocolinesterasa, encontrándose ésta localizada principalmente en el plasma, intestino, hígado y otros tejidos. Estas enzimas también se inhiben en presencia de los organofosforados aunque con escasa repercusión clínica.

Los pesticidas organofosforados actúan principalmente por inhibición de estas enzimas [3, 6, 7, 22, 23], originando la acumulación de Ach en las uniones donde es producida, por lo que los músculos, glándulas y nervios quedan en un estado

de estimulación permanente, produciendo una plétora de síntomas agudos que serán abordados en el apartado 7 [3, 7].

Se ha postulado que en la molécula de acetilcolinesterasa existen unos 50 sitios ó centros activos, de los cuales dos son de gran importancia: el aniónico con carga negativa y el esterásico o catalítico. El primero atrae al nitrógeno cuaternario de la acetilcolina cargado positivamente, mientras que el centro esterásico cataliza el proceso hidrolítico del sustrato, pudiendo ser acetilado mediante la unión con el aminoácido serina [10].

Los organofosforados actúan como un sustrato de la enzima, uniéndose electrostáticamente a la misma a través del sitio esterásico, fosforilándola, formando un complejo de gran estabilidad [6], como se observa en la Figura 3.

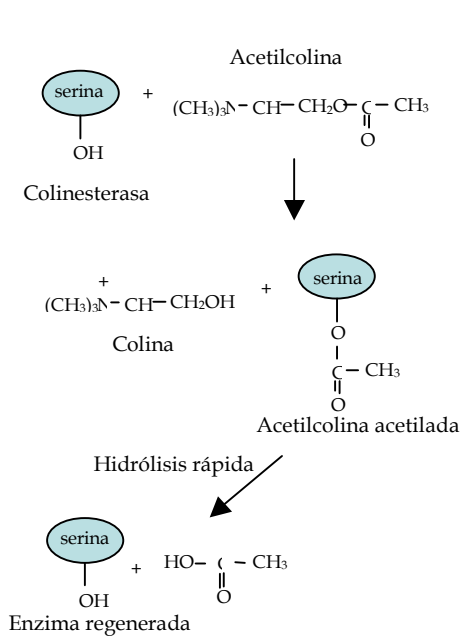


Figura 2. Mecanismo de acción de las colinesterasas [2].

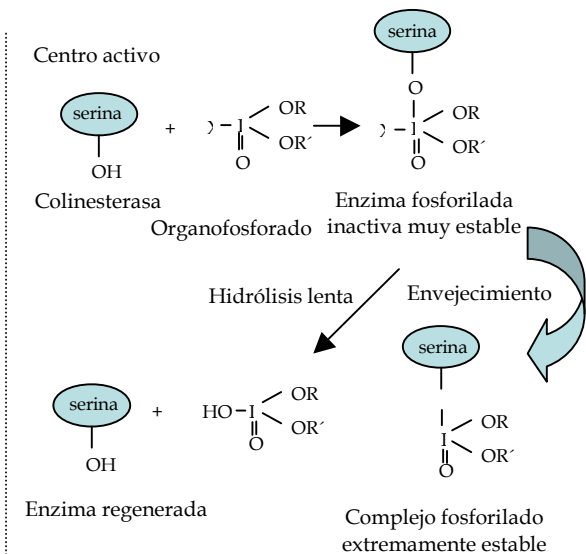


Figura 3. Inhibición de las colinesterasas en presencia de pesticidas organofosforados [22].

Dependiendo de los grupos sustituyentes R y R' así será la estabilidad de estos complejos, de esta forma, si se trata de grupos metilo o alquilo, la semivida del complejo es de 1-2 horas, aumentando a medida que se incrementa la longitud de los radicales alquilo. La presencia de grupos de amonio cuaternario aumenta también la acción inhibitoria, pues el organofosforado puede unirse a la enzima no sólo por el sitio esterásico sino también por el aniónico. Si el grupo Y es un radical alquilo o arilo, se hidroliza en el momento de la unión del insecticida con la enzima, mientras que si se trata de un átomo de flúor, se potencia la acción anticolinesterásica, dificultando la regeneración de las enzimas [5].

Entre las 24-48 horas siguientes a la formación del dímero, se hidroliza uno de los radicales R, con lo que aumenta la estabilidad de la unión enzima-sustrato, hasta el punto de considerarse irreversible la inhibición de la enzima. Este último proceso, denominado *envejecimiento de la enzima*, puede iniciarse algunos minutos o algunas horas tras la inhibición [22] y una vez que se ha producido, las oximas y otros regeneradores de las colinesterasas resultan inútiles. De hecho, los organofosforados se clasifican como inhibidores irreversibles de las colinesterasas, en oposición a compuestos como los carbamatos cuya acción es más fugaz (son inhibidores reversibles). Esta es la razón por lo que la recuperación de los niveles normales de colinesterasas, tras la intoxicación por organofosforados, puede requerir períodos superiores a los dos meses [5].

5. TOXICOCINÉTICA

Como indicamos anteriormente, los pesticidas organofosforados son, con algunas excepciones, líquidos altamente liposolubles, y muchos poseen altas tensiones de vapor. Los agentes menos volátiles son generalmente utilizados en forma de aerosol [6]. Consecuentemente, estos compuestos se absorben generalmente bien por todas las vías [4-6, 24], aunque la diversidad de sus propiedades químicas no

permite generalizar esta regla. Así, los compuestos volátiles, generalmente a partir de disoluciones o emulsiones acuosas, se absorben eficazmente a través de la membrana alveolo-pulmonar, pudiendo aparecer los primeros síntomas después de 5 minutos.

Las moléculas que poseen en su estructura un grupo amonio cuaternario son poco liposolubles y se absorben mal por vía digestiva, siendo su absorción dérmica prácticamente nula. La absorción por la piel no es uniforme en toda la superficie corporal, y además está sujeta a factores ambientales. Por ejemplo, una elevación de la temperatura o un aumento de la humedad relativa favorecen la absorción dérmica del paratión [8].

La distribución en los tejidos depende también de su liposolubilidad. Si ésta es alta, el tóxico se distribuye por el SNC y el tejido adiposo, observándose inmediatamente síntomas a nivel central. Por contra, si se trata de un compuesto poco liposoluble, la acción se desarrolla fundamentalmente en los receptores musculares, afectando a continuación a los ganglios autónomos y por último al SNC [5]. Aunque se distribuyen por todos los tejidos, las concentraciones más elevadas se alcanzan en hígado y riñones [8].

Sufren extensa biotransformación metabólica [2], proceso éste relativamente rápido, dependiendo del grupo químico saliente unido a la estructura del organofosforado y de la vía metabólica [22], e incluso pueden sufrir un ataque enzimático simultáneo en diversos sitios de la molécula. En el metabolismo de estos compuestos suelen participar mecanismos de desintoxicación de fase I y de fase II (Figura 4).

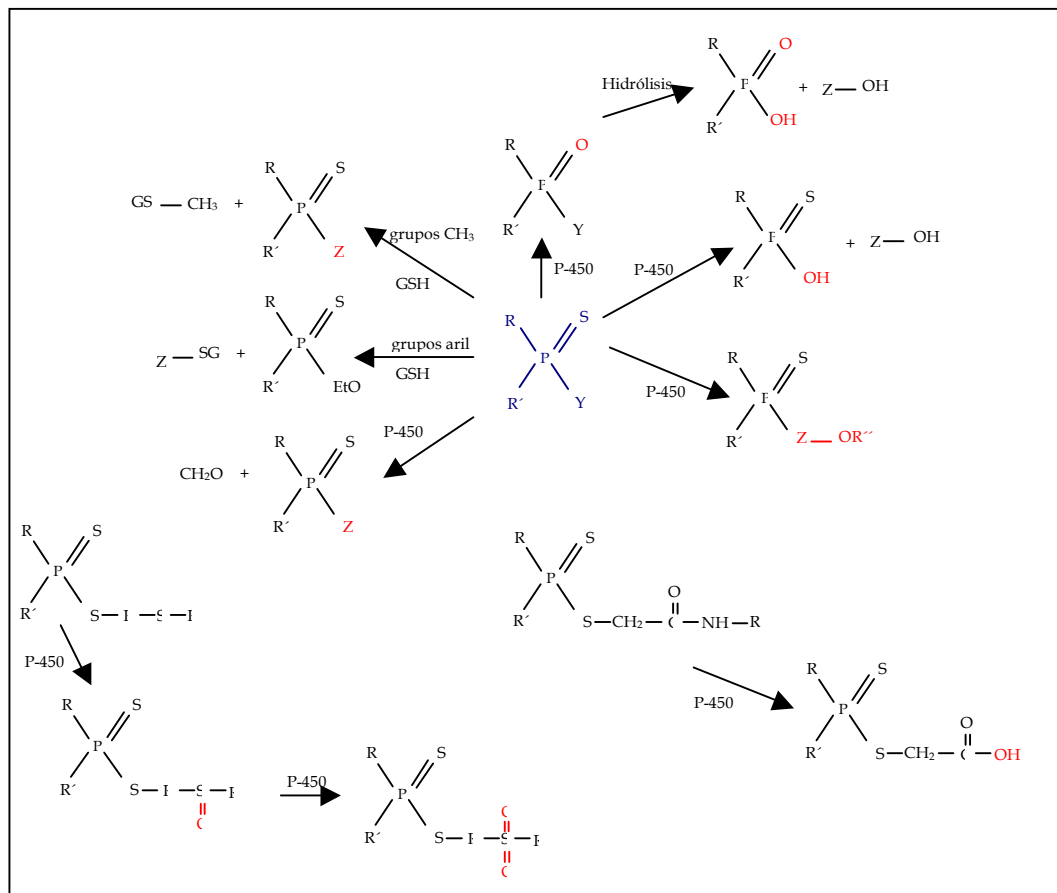


Figura 4. Proceso de biotransformación de los organofosforados en mamíferos [2].

Un elevado número de organofosforados necesitan ser previamente biotransformados en el hígado para actuar como inhibidores de las colinesterasas, en un proceso de activación metabólica. El metabolito formado es frecuentemente mucho más tóxico que el compuesto original. Este proceso ocurre por ejemplo con el paratión, originando por desulfuración oxidativa su bioactivado tóxico, el paraoxon [2].

En términos generales se calcula que entre el 75 y el 100% de los organofosforados administrados por vía oral son excretados por orina, ya que los productos resultantes del metabolismo, en su mayoría alquilfosfatos, son solubles

en agua. Habitualmente estos procesos de excreción duran entre 14 y 48 horas, pero debe tenerse en cuenta que en caso de la absorción dérmica, este período puede prolongarse [8]. Sin embargo, algunos organofosforados suelen también excretarse por orina en la forma inalterada [25].

6. DOSIS TÓXICAS

Las dosis tóxicas de estos compuestos son muy variables, e incluso para la misma sustancia, pueden ser muy distintas atendiendo a la vía de administración [26]. El gran número de organofosforados descubiertos hasta nuestros días, y la variabilidad en su toxicidad, impiden poder generalizar sus dosis tóxicas, por lo que es preferible hacer una clasificación de aquellos cuyo uso está más extendido en *muy tóxicos, tóxicos y nocivos* [5].

Como indicamos anteriormente, los pesticidas pueden ser clasificados según el grado de riesgo para el hombre. La legislación española (Real Decreto 162/1991) los clasifica en tres clases:

Plaguicidas sólidos (excepto cebos y tabletas)	Muy tóxicos	Oral	$DL_{50} \leq 5 \text{ mg/Kg}$
		Dérmica	$DL_{50} \leq 10 \text{ mg/Kg}$
	Tóxicos	Oral	$DL_{50} 5 - 50 \text{ mg/Kg}$
		Dérmica	$DL_{50} 10 - 100 \text{ mg/Kg}$
	Nocivos	Oral	$DL_{50} 50 - 500 \text{ mg/Kg}$
		Dérmica	$DL_{50} 100 - 1000 \text{ mg/Kg}$
Plaguicidas líquidos (incluidos cebos y tabletas)	Muy tóxicos	Oral	$DL_{50} \leq 25 \text{ mg/Kg}$
		Dérmica	$DL_{50} \leq 50 \text{ mg/Kg}$
	Tóxicos	Oral	$DL_{50} 25 - 200 \text{ mg/Kg}$
		Dérmica	$DL_{50} 50 - 400 \text{ mg/Kg}$
	Nocivos	Oral	$DL_{50} 200 - 2000 \text{ mg/Kg}$

		Dérmica	DL ₅₀ 400 - 4000 mg/Kg
Plaguicidas en forma de gases, aerosoles y polvo (tamaño de partícula < 50)	Muy tóxicos	Respiratoria	CL ₅₀ ≤ 0,5mg/L en aire
	Tóxicos		CL ₅₀ 0,5- 2 mg/L en aire
	Nocivos		CL ₅₀ > 2 mg/L en aire

CL₅₀ (Concentración letal 50); DL₅₀ (Dosis letal 50)

Aquellos pesticidas que tras la absorción por inhalación, ingestión y/o penetración cutánea pueden entrañar riesgos de gravedad limitada, son considerados *nocivos*. Los *tóxicos* son aquellos que tras la absorción pueden entrañar riesgos graves, agudos o crónicos, e incluso la muerte. Por último, los *muy tóxicos* son aquellos que tras la absorción pueden entrañar riesgos extremadamente graves, agudos o crónicos, e incluso la muerte [10].

Siguiendo esta clasificación, se consideran por ejemplo pesticidas tóxicos el azinfos metil, clorfenvinfos, etil y metil paratión, demeton y el sulfotep, y nocivos el diazinón, malatión, clorpirifos, quinalfos y diclorvos [5].

En cuanto a las concentraciones de este tipo de compuestos en fluidos biológicos, existen varias publicaciones y tablas de referencia, que son utilizadas para la atribución de causas de muerte o toxicidad [25, 27, 28].

7. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Como ya comentamos, debido a la acumulación de Ach en las sinapsis, se producen grandes perturbaciones de la transmisión nerviosa al prolongarse su efecto de forma excesiva [24]. En el cuadro clínico se pueden distinguir dos fases:

- o *La fase muscarínica*, o también denominada *efecto acetilcolínico*, corresponde a una hiperexcitabilidad general del parasimpático que se traduce en los siguientes síntomas: miosis, vómitos, calambres abdominales, sialorrea,

sudoración, tenesmo, incontinencia de heces y orina, hipersecreción bronquial, hipotermia y edema agudo de pulmón. En los casos más intensos se añade un broncoespasmo con signos de asma y bradicardia acentuada con parada cardíaca [2, 4-7, 29].

- A continuación sigue la *fase nicotínica*, en la que se presentan síntomas correspondientes a la estimulación de las fibras motoras, a la cual se unen los efectos sobre el SNC. Esta sintomatología consiste en taquicardia, hipertensión [2, 7, 29], sacudidas musculares que se localizan inicialmente en los párpados y lengua, y después en los músculos de la cara y cuello, generalizándose, por último a todo el organismo y aumentando en su intensidad hasta producir un cuadro convulsivo de tipo epileptiforme; en el último estadio se produce una parálisis motora que se localiza precozmente en los músculos respiratorios, ocasionando asfixia [24]. Las manifestaciones sobre el SNC consisten en cefaleas, cansancio ligero, vértigo, ansiedad, confusión, depresión del centro respiratorio, cianosis y coma [2, 6, 7]. La persistencia de manifestaciones nicotínicas durante más de siete días puede deberse a múltiples causas: a la persistencia de la inhibición de la acetilcolinesterasa, a la absorción del tóxico desde el tracto intestinal, donde puede permanecer después de varios días cuando se ha realizado un tratamiento masivo con atropina (retrasa el tránsito digestivo), o a la liberación progresiva del tóxico procedente de los tejidos de depósito (tejido adiposo) al torrente sanguíneo [4].

Los síntomas anteriores se combinan de forma diferente, en relación con la dosis de tóxico absorbida, dando lugar a las intoxicaciones agudas, crónicas y a los cuadros de neurotoxicidad retardada [9].

INTOXICACIÓN AGUDA

Es la forma más frecuente de intoxicación por insecticidas organofosforados. Los efectos se inician rápidamente, en general a la media hora de la absorción, aunque pueden retrasarse hasta 3 o 4 horas, según las circunstancias de la exposición [10]. Algunos organofosforados como el diclorofentión, que tienen coeficientes de partición hexano/agua muy elevados (> 13700), pueden acumularse en el tejido adiposo, generando síntomas pasadas 24-48 horas [5].

Inicialmente aparecen molestias digestivas como vómitos, dolor abdominal y diarrea. A medida que el cuadro clínico evoluciona, los signos muscarínicos y nicotínicos van siendo más claros. Hay hipersalivación, diaforesis, miosis, fasciculaciones y debilidad muscular, hipersecreción bronquial y a veces broncoconstricción con sibilancias, bradicardia, alteración de la consciencia con confusión y/o psicosis tóxica. Si la evolución se agrava puede haber convulsiones, arritmias cardíacas con bradicardia, y la hipoxia por broncoconstricción da lugar a cianosis intensa y midriasis [5, 24].

Tras una intoxicación aguda, la muerte puede ocurrir en menos de 5 minutos, pudiendo retrasarse hasta las 24 horas, dependiendo de la dosis, vía de absorción, agente y otros factores [6].

También puede haber alteración de los parámetros bioquímicos, con hiperpotasemia, aumento de catecolaminas y de sus productos de degradación, y aumento de la glucemia, pudiendo, incluso, aparecer glucosuria.

En la mayor parte de los casos, el cuadro clínico es llamativo durante los primeros 4-6 días de evolución, y a partir de las 2-3 semanas el paciente mejora hasta el punto de no necesitar medicación. Especial atención merecen las complicaciones cardíacas, que pueden surgir varios días después de la

intoxicación, e incluso cuando ya los otros signos han mejorado hasta casi desaparecer [5].

En algunos casos puede producirse el denominado *síndrome intermedio*, descrito en 1987 por Senanayake y Karalliede en casos de suicidio [30], y cuya sintomatología no se corresponde con la de la fase aguda ni con la de la neurotoxicidad retardada [4]. Consiste en una serie de alteraciones neurológicas que surgen de 24 a 48 horas después de la recuperación del paciente de la fase colinérgica [5]. El síndrome es, básicamente, una parálisis muscular que afecta principalmente a los músculos respiratorios, flexores del cuello, proximales de las extremidades y músculos dependientes de los pares craneales. La parálisis puede ser suficientemente intensa como para requerir respiración asistida. Dicha parálisis persiste hasta 18 días y puede evolucionar a la recuperación total o a un cuadro de toxicidad retardada [4]. Pesticidas como fentión, dimetoato o metamidofos, entre otros, ocasionan este tipo de cuadro clínico, que no suele responder a la atropina ni a las oximas [31].

INTOXICACIÓN CRÓNICA

La intoxicación crónica por organofosforados, frecuente en los trabajadores que efectúan fumigaciones, es un cuadro de difícil diagnóstico, salvo por la anamnesis y la determinación de colinesterasas. Aunque poco estudiados, existen fenómenos de adaptación complejos a la reducción de la actividad de las colinesterasas, y no es infrecuente que esta actividad haya descendido hasta el 50% sin que se observen signos agudos de intoxicación [31]. Este cuadro se caracteriza por disnea, vértigo, visión borrosa, cefaleas y, durante las fases de exacerbación, hay náuseas, vómitos, diarreas y dolores cólicos. El intoxicado se colapsa y se encuentra frío y pálido, con abundante sudoración y miosis intensa. Se produce también hipersecreción bronquial que, unida a la hipotensión,

conduce a un colapso circulatorio y respiratorio, que termina a menudo en edema agudo de pulmón. Hacia el final el sujeto queda flácido, la cianosis se intensifica y se produce la muerte por parálisis respiratoria o bloqueo cardíaco auriculoventricular.

Los casos mortales suelen tener una duración de 3 o 4 horas. En los que hay supervivencia, la recuperación es lenta e interferida por distintos trastornos, como cefalea, astenia, ansiedad, etc. El pronóstico está ensombrecido por la posible aparición de parálisis tardías de las extremidades, secundarias a la desmielinización medular [24].

NEUROTOXICIDAD RETARDADA

Algunos organofosforados (fentión, clorpirifos, tricloronato, paratión, etc), generalmente triarílicos o fluorados, ejercen una acción tóxica selectiva sobre el sistema nervioso periférico produciendo polineuropatías mixtas con desmielinización y degeneración axonal, especialmente marcadas en los miembros inferiores [30, 31]. Este cuadro denominado *neurotoxicidad retardada* se origina característicamente de 1 a 2 semanas después de la exposición aguda, o tras la exposición crónica [4, 31], y en ocasiones tras una dosis única de algunos organofosforados [32].

Inicialmente se traduce en pérdida de fuerza, parestesias, calambres y fatigabilidad en los miembros inferiores. Posteriormente aparecen trastornos de la marcha, que pueden progresar a parálisis. Tras cesar la exposición, hay una lenta mejoría en las semanas, meses, e incluso años siguientes, aunque la recuperación no es completa en todos los casos [6, 31].

Este efecto no está relacionado con la inhibición de la acetilcolinesterasa ni de otras enzimas hidrolíticas, pero sí con la inhibición de la esterasa neuropática (NTE) [33, 34], enzima existente en los axones de los nervios periféricos y cuya

conjugación con el organofosforado, y posterior unión estable por envejecimiento del dímero (similar a la que experimentan las colinesterasas) generaría las lesiones nerviosas [10, 31, 32].

A pesar de pertenecer también al grupo de los inhibidores de las colinesterasas, los carbamatos no inhiben la NTE ni desencadenan neurotoxicidad retardada [31].

8. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico clínico de esta intoxicación es difícil, salvo que se disponga por la anamnesis del antecedente de exposición a pesticidas organofosforados. La exploración del paciente puede evidenciar una halitosis característica a compuestos fosforados [4]. La presencia de signos muscarínicos y nicotínicos es, a veces, confusa y de difícil valoración.

El principal diagnóstico diferencial de esta intoxicación se plantea con los pesticidas pertenecientes al grupo de los carbamatos y con otros anticolinesterásicos como la fisostigmina, neostigmina, etc. La ingestión de setas con acción muscarínica (*Amanita muscaria*) también puede producir un cuadro muscarínico parcialmente similar a esta intoxicación [5].

La determinación de la colinesterasa sérica o eritrocitaria tiene un gran valor diagnóstico, hallándose niveles inferiores a la normalidad en la práctica totalidad de los casos. Sin embargo, tiene un valor limitado para evaluar la gravedad de la intoxicación ya que no se ha encontrado correlación entre la actividad plasmática de la misma y la morbimortalidad, ni tampoco con la evolución clínica experimentada. Según estos datos, la terapia no puede estar condicionada a la actividad de la colinesterasa plasmática, y el valor de ésta quedaría circunscrito al diagnóstico de la intoxicación [4].

En los casos leves y moderados de la intoxicación, la tasa de enzima corresponde a un 40 o 50% de los valores normales, mientras que en los casos más graves tales valores sólo alcanzan un 20%, pudiendo incluso desaparecer totalmente [24].

Puesto que hay organofosforados que inhiben, casi selectivamente, las pseudocolinesterasas, sería conveniente medir también su actividad. No obstante debido a la complejidad que ofrece su determinación, puede ser suficiente medir sólo las colinesterasas verdaderas, que son las que indican el auténtico grado de intoxicación.

Algunos factores tales como la anemia megaloblástica o el uso de fármacos antimaláricos pueden falsear los resultados, ya que disminuyen los niveles de las ACE. Las BuCE son también afectadas por múltiples factores, entre los que cabe destacar las hepatopatías, el embarazo, la malnutrición, etc. Incluso hay individuos que tienen déficit congénito de estas enzimas. Los resultados también pueden ser falseados durante la recogida de las muestras de sangre, si se utilizan otros agentes anticoagulantes diferentes de la heparina [5].

Las BuCE son sintetizadas en el hígado y regeneradas rápidamente (días o semanas), mientras que las ACE pueden tardar de 2 a 3 meses (hasta 6 meses en algunos casos) en recuperar su actividad normal [5, 24]. Generalmente, y dependiendo del organofosforado responsable del cuadro, no se recuperan valores suficientes de actividad que permitan cesar la medicación durante períodos que van desde las 24 horas hasta varios días.

9. TRATAMIENTO

El objetivo inicial del tratamiento es frenar la absorción del tóxico, por ello se procederá a un tratamiento evacuante acorde con la vía de absorción [5]. Así si la absorción ha sido por vía dérmica, se retirará toda la ropa al paciente y se procederá al lavado de la piel con agua a diferentes temperaturas [29]. Si el tóxico ha sido ingerido, se procederá a efectuar un lavado gástrico seguido de la administración de carbón activo. Si se dispone de atropina y oximas, se iniciará la administración de ambas. En el caso de que la respiración se encuentre comprometida se procederá a la administración de oxígeno al paciente.

El antídoto específico es el *sulfato de atropina* [6], ya que antagoniza eficazmente los efectos muscarínicos y sobre el SNC ocasionados por los organofosforados, aliviando la hipersecreción, las náuseas, vómitos, miosis, bradicardia, etc. [6, 29]. No obstante, no tiene acción marcada sobre los efectos nicotínicos. De hecho las afecciones musculares, especialmente las más graves que afectan a los músculos respiratorios, son refractarias al tratamiento [29], pudiendo ser únicamente revertidas por la acción de reactivadores de la acetilcolinesterasa [4]. Inicialmente debe administrarse 1 mg (adultos) y 0,015 mg/kg (niños) por vía intravenosa, valorando la posible mejoría del paciente en los 5-10 minutos siguientes. Si se produce mejoría, o si existe seguridad en el diagnóstico, se administrarán de 2-4 mg cada 15 minutos. Sólo en las intoxicaciones graves puede ser necesario administrar dosis masivas (gramos) hasta alcanzar la atropinización [29].

Las *oximas* (R-CH=NOH) son agentes nucleofílicos capaces de estimular la reactivación de la acetilcolinesterasa [6]. Se utilizan como tratamiento coadyuvante o complementario tras la atropinización, que nunca debe de ser sustituida. Los compuestos más importantes de esta clase son la obidoxima,

pralidoxima y la diacetilmonooxima. Se administran por vía intravenosa lenta, vía oral o vía intramuscular, las dosis varían según la oxima y la respuesta suele ser rápida. Sin embargo, las enzimas envejecidas son resistentes a la acción regeneradora de las oximas, pues el dímero no es accesible al ataque nucleofílico. Por lo tanto, su administración debe ser realizada durante las primeras 24 horas tras la intoxicación, ya que transcurridas 48 horas dejan de ser eficaces [5]. Por otra parte, la intoxicación producida por algunos organofosforados como dimetoato, dimetox y trimetoato es poco sensible a la acción de éstas [4].

10. ETIOLOGÍA DE LAS INTOXICACIONES

Las formas etiológicas médico-legales más frecuentes son:

- *Intoxicaciones accidentales:* En su mayor parte son de origen profesional, afectando a individuos que trabajan en la preparación de los pesticidas o en su aplicación. Están documentados algunos casos de intoxicación entre los pilotos que trabajan en fumigaciones aéreas con estas sustancias [5, 24]. También pueden deberse a intoxicaciones alimentarias por falta de higiene y/o por mala manipulación de los alimentos. Otras intoxicaciones accidentales son debidas a la confusión por manipulación imprudente, rotulación y/o conservación errónea de los envases e incluso por falta de vigilancia en niños.

- *Intoxicaciones suicidas:* Se han hecho más frecuentes a medida que se ha extendido el uso de estas sustancias, lo que, en definitiva, facilita el acceso a las mismas. Ocurren principalmente en el medio agrícola y a veces están asociadas a otro tipo de tentativas de suicidio, como por ejemplo el ahorcamiento.

- *Envenenamientos criminales.* Este tipo de intoxicación no es frecuente, pero se conocen algunos casos, aprovechando su elevada toxicidad [35]. Como la cantidad necesaria para provocar la muerte es reducida, si el preparado comercial de organofosforado es suficientemente concentrado es posible disimular sus acusadas propiedades organolépticas mezclándolo con diversos alimetos, y haciendo que pasen inadvertidos tanto su olor como su sabor. [24].

11. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS INTOXICACIONES

- CASUÍSTICA EN ESPAÑA

Se desconoce el número exacto de intoxicaciones provocadas por estos compuestos en nuestro país. Según un estudio efectuado en el año 1996 en el Hospital Torrecárdenas de Almería [36], entre los años 1981 a 1992 llegaron a este hospital 506 casos que presentaban síntomas compatibles con una intoxicación por organofosforados. Según el mismo estudio en 234 casos el organofosforado responsable fue el metamidofos, seguido del clorpirifos (81 casos), metilparatión (40 casos), paratión (36 casos), diazinón (4 casos), dimetoato (3 casos) y fenitrotión (2 casos). En 106 casos no se pudo determinar el tipo exacto del tóxico empleado. En dicha casuística el 88% de las intoxicaciones se produjeron en varones, en edad laboral y la principal vía de absorción del tóxico fue la cutáneo-respiratoria. En cuanto a la etiología de las intoxicaciones, en 405 casos ocurrió de forma accidental, en su mayoría trabajadores de invernaderos que no guardaban las medidas de seguridad adecuadas. Únicamente en el 20% de los casos hubo intención suicida.

Coincidiendo con los datos mostrados sobre la comercialización de estas sustancias en España, las intoxicaciones por organofosforados son más frecuentes

en Canarias, Murcia, Valencia y especialmente Almería. La razón de la elevada frecuencia de esta última, según cita el mismo estudio, se debe a su masiva utilización en la agricultura y al elevado número de personas que trabajan en las explotaciones agrícolas, principalmente en invernaderos.

○ CASUÍSTICA EN PORTUGAL

En el caso de Portugal, estos pesticidas aparecen asociados frecuentemente a intoxicaciones humanas, siendo muchas las solicitudes de rastreo de organofosforados en las muestras que llegan a los laboratorios de Toxicología procedentes de autopsias o de hospitales. Quizás, como indicamos anteriormente esta frecuencia sea debida a la facilidad con la que estas sustancias son adquiridas así como a la elevada toxicidad de las mismas.

Los datos que poseemos pertenecen a la Delegación de Coimbra del INML, que es donde se realizó este trabajo, y abarcan toda la zona centro del país incluyendo los archipiélagos de las Azores y Madeira.

Según datos de dicha institución se realizan una media de 237 solicitudes de rastreo de pesticidas al año, de las cuales aproximadamente un 10 % son positivas para organofosforados (Tabla 2). Asimismo, se puede constatar la tendencia a un ligero incremento de esta cifra a lo largo de los años.

Tabla 2. Solicitudes de rastreo de pesticidas efectuadas a la Delegación de Coimbra del INML y casos positivos entre 2000 y 2005.

	AÑO					
	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Nº de análisis solicitados	149	240	271	269	258	309*
Nº de análisis positivos para POF	13	34	21	17	31	10**

*Hasta octubre de 2005; **Hasta agosto de 2005

Analizando el número de casos positivos para organofosforados, constatamos que únicamente un 20,6% procedían de Servicios Hospitalarios.

En cuanto a la etiología de las intoxicaciones, en aquellos casos en que había información disponible (21,4%), el 85,2% fue de etiología suicida, 7,4% accidentales y 7,4% homicidios ó tentativas de homicidio (uno de los cuales procedía de un hospital).

Curiosamente la mayor parte de las intoxicaciones confirmadas (Figura 5) se deben al quinalfos y al paratión, dos pesticidas que ya no están comercializados en Portugal, lo que implica que todavía existen almacenadas cantidades significativas.

En 14 casos se comprobó que la intoxicación era provocada por la asociación de organofosforados :quinalfos + diclorvos (1 caso), quinalfos + sulfotep (4 casos), demeton + oxidemeton (1 caso), demeton + metasistox (1 caso), fentión + dimetoato (1 caso), azinfos metil + azinfos etil (1 caso), clorfenvinfos + fentión (1 caso), paratión + quinalfos (2 casos), paratión + ometoato (1 caso), paratión + sulfotep + azinfos etil (1 caso).

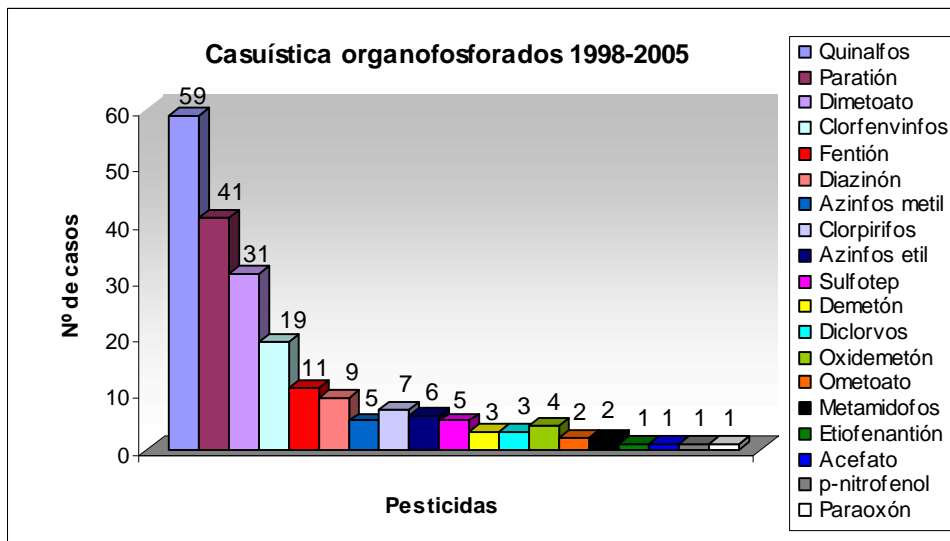


Figura 5. Intoxicaciones por pesticidas organofosforados entre 1998 y 2005.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] World Health Organization. Directrices sobre la gestión de los plaguicidas para la salud pública. [documento online] 2003 [consultado 2004 Dic 11]. Disponible en: URL: http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_WHOPEPES_2003.7_spa.pdf.
- [2] Ecobichon DJ. Toxic effects of pesticides. In: Klaassen CD, editor. Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons. 5th ed. New York: McGraw-Hill; 1996, p. 643-689.
- [3] Kala M. Pesticides. In: Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, editors. Clarke's analysis of drugs and poisons. 3rd ed. London: Pharmaceutical Press; 2004, p. 202-226.
- [4] Ferrer Dufol A, Martínez Chuecos J. Insecticidas. In: Marruecos L, Nogué S, Nolla J, editors. Toxicología Clínica. Barcelona: Springer-Verlag Ibérica, S.A.; 1993, p. 233-241.
- [5] Ladrón de Guevara J, Moya Pueyo V. Plaguicidas. In: Ladrón de Guevara J, Moya Pueyo V. Toxicología médica clínica y laboral. New York: Interamericana McGraw Hill; 1995, p. 459-510.
- [6] Taylor P. Anticholinesterase agents. In: Hardman JG, Limbird LE, editors-in-chief. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 9th ed. New York: McGraw Hill; 1996, p. 161-176.
- [7] Saunders DS, Harper C. Pesticides. In: Hayes AW. Principles and methods of toxicology. 3rd ed. New York: Raven Press; 1994, p. 389-415.
- [8] Obiols Quinto J. NTP 512: Plaguicidas organofosforados (I): aspectos generales y toxicocinética. [documento online] [consultado 2004 Dic 10]. Disponible en: URL: http://www.mtas.es/insht/ntp/ntp_512.htm.
- [9] Eto M. Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry. Cleveland: CRC Press; 1974.

[10] de la Iglesia Huerta A, Delgado Cobos P. Plaguicidas: Neurotoxicidad y Vigilancia de la Salud. Instituto Nacional de Seguridad en el trabajo (ISNH) 2000; 8: 4-14.

[11] Noble A, Review: Partition coefficients (n-octanol-water) for pesticides. J Chromatogr 1993; 642: 3-14.

[12] Tomlin CDS, editor. The pesticide manual. 11th ed. British Crop Protection Council, Surrey; 1997.

[13] Asociación Empresarial para la Protección de plantas. Cifras Mercado Español-Mercado Europeo. [documento online] 2005 [consultado 2005 Oct 14]. Disponible en: URL: <http://www.aepla.es/docs/Cifras.pdf>.

[14] Ministerio de Sanidad y Consumo. Productos Químicos. [documento online][consultado 2005 Oct 2]. Disponible en: URL: http://www.msc.es/disenio/medioAmbient/ambiente-_productos_quimicos.htm.

[15] Direcção-Geral de Protecção das Culturas. Guia dos produtos fitofarmacêuticos - lista dos produtos com venda autorizada; 1995.

[16] Direcção-Geral de Protecção das Culturas. Guia dos produtos fitofarmacêuticos - lista dos produtos com venda autorizada; 2003.

[17] Direcção-Geral de Protecção das Culturas. Insecticidas e Acaricidas [documento online] 2004 [consultado 2005 Oct 2]. Disponible en: URL: http://www.dgpc.min-agricultura.pt/fitofarmaceuticos/lista/Introd_lista/insec_acar_lista.htm.

[18] Dirección general de Salud Pública. Legislación. [documento online] 2005 [consultado 2005 Ag 14]. Disponible en: URL: http://www.msc.es/disenio/medioAmbient/ambiente_productos_quimicos.htm.

[19] Moreno Marí J, Meliá Llácer A, Oltra Moscardó MT, Jiménez Peydró R. Situación actual en España de los aerosoles insecticidas registrados en sanidad ambiental para uso doméstico. Rev Esp Salud Pública 2003; 77: 383-391.

- [20] Direção-Geral de Protecção das Culturas. Guia dos produtos fitofarmacêuticos – lista dos produtos com venda autorizada; 2005.
- [21] González AM, Flórez J. Transmisión Colinérgica. Fármacos agonistas colinérgicos. In: Flórez J. Farmacología humana. 3ª ed. Barcelona: Masson, S.A.; 1997, p. 213-227.
- [22] Neves MTC, Martins RMM. A toxicidade dos pesticidas. Principais acções tóxicas de alguns pesticidas mais comuns. Farmácia Portuguesa 1988; 52: 22-28.
- [23] Neves MTC, Martins RMM. A toxicidade dos pesticidas II. Principais acções tóxicas de alguns pesticidas mais comuns. Revista Portuguesa de Farmácia 1989; XXXIX: 48-54.
- [24] Gisbert Calabuig JA, Villanueva Cañadas E. Intoxicaciones por plaguicidas. In: Gisbert Calabuig JA. Medicina legal y toxicología. 5ª ed. Barcelona: Masson, S.A.; 1998, p. 806-816.
- [25] Baselt RC. Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 7th ed. Foster City: Biomedical Publications, 2004.
- [26] U.S. Environmental Protection Agency. Reconocimiento y manejo de los envenenamientos por pesticides, 5th ed. [documento online] 2002 [consultado en 2005 Abr 10]. Disponible en: URL: <http://www.epa.gov/oppfead1/safety/spanish/healthcare/handbook/contents.htm>.
- [27] Uges DRA. Therapeutic and toxic drug concentrations list. [documento online] 2002 [consultado en 2002 Jun 17]. The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT). Disponible en: URL: http://www.tiaft.org/tmembers/ttv/ttv_ps.html.
- [28] Musshoff F, Padosch S, Steinborn S, Madea B. Fatal blood and tissue concentrations of more than 200 drugs. Forensic Sci Int 2004; 142: 161-210.
- [29] Ellenhorn MJ, Schonwald S, Ordog G, Wasserberger J. Pesticides. In: Ellenhorn MJ. Ellenhorn's medical toxicology: Diagnosis and treatment of human poisoning. 2nd ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1997, p. 1614-1663.

- [30] Miguel MG, Sousa SIG, Cardoso JCR. Efeitos tóxicos dos pesticidas. Rev. Portuguesa de Farmácia 1999; XLIX: 105-120.
- [31] Ecobichon DJ. Efectos tóxicos de los pesticidas. In: Klaasen CD, Watkins JB, editors. Casarett y Doull. Fundamentos de toxicología (Edición Española revisada por López-Rivadulla M). Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2003, 339-353.
- [32] Lauwerys RR. Toxicología industrial e intoxicaciones profesionales. Barcelona: Masson S.A.; 1994, 487-539.
- [33] Vilanova E, Barril J, Carrera V. Biochemical properties and possible toxicological significance of various forms of NTE. Chem Biol Interact 1993; 87(1-3): 369-381.
- [34] Barril J, Tormo N, Díaz-Alejo N, Vilanova E. Organophosphorus inhibition and heat inactivation kinetics of particulate and soluble forms of peripheral nerve neuropathy target esterase. J Biochem Toxicol 1995; 10(4): 211-218.
- [35] Satoh T, Hosokawa M. Organophosphates and their impact on the global environment. Neurotoxicology 2000, 21: 223-227.
- [36] Martín Rubí JC, Yélamos Rodríguez F, Laynez Bretones F, Córdoba Escámez J, Déz García F, Lardelli Claret A, et al. Intoxicaciones por insecticidas organofosforados. Estudio de 506 casos. Revista Clínica Española 1996; 3: 145-149.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Extracción Líquido-Líquido	53
2. Extracción en Fase Sólida	54
3. Microextracción en Fase Sólida	55
Referencias Bibliográficas	70

Las técnicas para la determinación de pesticidas organofosforados han ido evolucionando a lo largo de los años, desde las primeras reacciones colorimétricas utilizadas en los años 50 [1] hasta las más avanzadas y actuales, como la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masa (LC/MS).

Si hablamos de las técnicas no cromatográficas, existen tests rápidos basados en la inhibición de las colinesterasas para la identificación de este tipo de compuestos en plasma. Se trata de una técnica sencilla que consiste en la adición de acetilcolina yodada a la muestra. El color amarillo se volverá más tenue en presencia de pesticidas organofosforados [2].

Existen también ensayos inmunológicos (ELISA) que pueden ser utilizados para la identificación de estas sustancias en muestras de agua [3-6], vino [7] y vegetales [8]. Sin embargo, su aplicación a muestras biológicas no se encuentra documentada.

Las técnicas más utilizadas son, sin duda alguna, las que emplean cualquier tipo de cromatografía. Para que éstas puedan ser utilizadas, por regla general son necesarias la extracción y purificación previa de los analitos a partir de la matriz en la que se encuentran. Son precisamente estas últimas las que han constituido el objeto de nuestro trabajo, y sobre las que vamos a centrar esta revisión bibliográfica. Por ello, y para facilitar la comprensión de este capítulo, vamos a dividirlo según las diferentes técnicas de extracción:

1. Extracción líquido-líquido.
2. Extracción en fase sólida.
3. Microextracción en fase sólida.

1. EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

Este tipo de extracción es el más extendido y utilizado por la mayor parte de los laboratorios. Se trata de una técnica sencilla que se basa en la diferencia de solubilidad del analito entre la matriz donde se encuentra y el solvente de extracción. De esta forma, el solvente ideal será aquel que sea capaz de extraer la mayor cantidad de analito posible y que reduzca al mínimo el número de interferencias. Para lograr esto, es habitual la realización de varios pasos de extracción utilizando diferentes solventes o mezclas de solventes.

Los solventes utilizados en la extracción de organofosforados incluyen acetona [9-11], cloroformo [12, 13], acetonitrilo [13-15], tolueno/hexano (3:1, v/v) [16], hexano/acetona (4:1, v/v) [17], acetato de etilo [18-21], diclorometano/acetonitrilo [22], tolueno/metanol (3:1, v/v) [23], dietiléter [24-27], metil-t-butiléter [28], metanol/hexano (1:6, v/v) [19], tolueno [29], n-hexano [13, 30, 31], diclorometano [32], n-hexano/acetato de etilo (75:25, v/v) [33], acetona/diclorometano [34, 35], hexano/acetonitrilo [36] y metanol/agua [37].

2. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La extracción en fase sólida (SPE) fue introducida a mediados de los años 70. Esta técnica, similar a la cromatografía líquida de baja presión, es sencilla y práctica proporcionando a menudo extracciones más eficientes y selectivas que la tradicional extracción líquido-líquido (LLE) [38]. Pese a que la LLE es una técnica que demostró ser apropiada en numerosas situaciones, posee algunas desventajas como la formación de emulsiones, las posibles interferencias con la matriz, o el elevado volumen de disolventes que son empleados y que constituyen un problema, no sólo en el laboratorio, sino también a nivel medioambiental [39]. La SPE puede solventar la mayor parte de estas

desventajas, no obstante se trata de una técnica con mayores costes económicos y que necesita de un mayor tiempo para la realización completa de las extracciones.

Consiste básicamente en el paso de una muestra líquida a través de un cartucho de extracción (cartuchos desechables y de diferente composición). Los analitos son adsorbidos en el material de relleno por diferentes mecanismos y posteriormente son eluidos con un solvente adecuado en el fin del proceso. El principal objetivo de la SPE es la retirada cuantitativa del analito de la muestra en que se encuentra, eliminando en el mismo proceso los interferentes de la matriz (proteínas, sales, urea, etc.), y su posterior concentración en un pequeño volumen de solvente, adecuado para el análisis cromatográfico.

El uso de esta técnica para la determinación de pesticidas organofosforados se encuentra documentado en la literatura científica, utilizando diversos tipos de cartucho de extracción.

Los rellenos más utilizados son los que poseen en su composición octadecilsilano (C₁₈) [13, 32, 33, 40-52], aunque también son utilizados rellenos de florisil [11, 16, 23], sílice [30], tierra de diatomeas [53-55], y aminopropil [56]. Más recientemente se han utilizado columnas poliméricas de polivinildibenceno [20, 57], etilvinilbenceno-divinilbenceno [58], poliestirenodivinilbenceno [47, 57, 59] y de polidivinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona [30, 52, 59].

También está descrita la determinación de pesticidas empleando la dispersión de la matriz en fase sólida (DMFS) [36, 61-65].

3. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Dentro de este apartado hemos realizado una exhaustiva revisión bibliográfica sobre las publicaciones en las que la microextracción en fase sólida (SPME) fue utilizada en el análisis toxicológico de pesticidas organofosforados. Como

veremos más adelante, se trata de una técnica reciente (principios de la década de los 90) cuyas primeras aplicaciones fueron en el campo medioambiental, y quizás por ello, el número de trabajos publicados en este ámbito es elevado, frente al escaso número de contribuciones existentes hasta el momento en revistas especializadas sobre su aplicación a fluidos biológicos (7 artículos).

Una de las ventajas que posee esta técnica es que integra en un único paso la extracción, la concentración y la introducción de los analitos en el sistema cromatográfico.

Además la SPME es versátil en sus aplicaciones, pudiendo ser utilizada con diferentes tipos de detectores acoplados a cromatografía de gases y líquidos, si bien esta última es menos frecuente debido a los problemas existentes con las interfaces SPME/HPLC.

A continuación se resumen las principales aplicaciones de la SPME a la determinación de organofosforados en diferentes matrices, resaltando los aspectos más relevantes de cada una de ellas.

PESTICIDAS	MUESTRA	TIPO DE FIBRA	CROMATOGRAFÍA	DATOS DE VALIDACIÓN	REFERENCIA
<ul style="list-style-type: none"> • TEPP • Tionacina • Sulfotep • Forato • Disulfoton • Metil paratión • Malatión • Paratión • Famfur 	Agua	100 µm PDMS (DI-SPME)	GC	-	Shirey 1997 [66]
<ul style="list-style-type: none"> • TEPP • Tionacina • Sulfotep • Forato • Dimetoato • Disulfoton • Metil paratión • Malatión • Paratión • Famfur 	Agua	100 µm PDMS (DI-SPME)	GC	-	Supelco 1997 [67]

PESTICIDAS	MUESTRA	TIPO DE FIBRA	CROMATOGRAFÍA	DATOS DE VALIDACIÓN	REFERENCIA
<ul style="list-style-type: none"> • Malatión 	Sangre	100 µm PDMS (HS-SPME)	GC/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Linealidad: 2,5-50,0 µg/g • LOD: 1,0 µg/g 	Namera 1997 [68]
<ul style="list-style-type: none"> • Malatión • Paratión 	Agua	<ul style="list-style-type: none"> • 7 µm PDMS • 30 µm PDMS • 85 µm PA • 65 µm CW/DVB • 65 µm PDMS/DVB (DI-SPME) 	GC/FID	-	Sng 1997 [69]
<ul style="list-style-type: none"> • Forato • Fonofos • Clorpirifos metil • Fenitrotión • Malatión • Fentión • Clorfenvinfos • Metidatión • Fenamiphos • Etión • Fosadona 	Agua	<ul style="list-style-type: none"> • 100 µm PDMS • 85 µm PA (DI-SPME) 	GC/NPD	<ul style="list-style-type: none"> • Linealidad: 0,1-10 ng/mL • LOD: 0,006-0,5 ng/mL 	Beltrán 1998 [70]

PESTICIDAS	MUESTRA	TIPO DE FIBRA	CROMATOGRAFÍA	DATOS DE VALIDACIÓN	REFERENCIA
<ul style="list-style-type: none"> • Diclorvos • Mevinfos • Etotrop • Naled • Forato • Demetón • Diazinón • Disulfoton • Metil paratión • Ronnel • Fentión • Clorpirifos • Tricloronato • Merfos • Stirofos • Tokutión • Fensulfotión • Bolstar • Azinfos metil • Coumafos 	Agua	85 µm PA (DI-SPME)	GC/MS	• LOD: 0,10-0,56 ng/mL	Supelco 1999 [71]

PESTICIDAS	MUESTRA	TIPO DE FIBRA	CROMATOGRAFÍA	DATOS DE VALIDACIÓN	REFERENCIA
<ul style="list-style-type: none"> • Metil paratión • Paratión 	Sangre	100 µm PDMS (HS-SPME)	GC/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Linealidad: 0,1-5 µg/g • LOD: 0,02-0,05 µg/g 	Musshoff 1999 [72]
<ul style="list-style-type: none"> • Diazinon • Fenitrotión • Fentión • Quinalfos • Triazofos • Fosalón • Pirazofos 	<ul style="list-style-type: none"> • Fruta • Zumos 	100 µm PDMS (DI-SPME)	GC/FPD	<ul style="list-style-type: none"> • Linealidad: 0,250-25 ng/mL • LOD: 0,003-0,014 ng/mL 	Simplício 1999 [73]
<ul style="list-style-type: none"> • Paratión 	Fresas	100 µm PDMS (DI-SPME)	GC/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Linealidad: 4-500 ng/g • LOD: 1 ng/g 	Hu 1999 [74]
<ul style="list-style-type: none"> • Sulfotep • Diazinón • Metilparatión • Malatión • Paratión 	Zumo de frutas	100 µm PDMS (DI-SPME)	GC/FID GC/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Linealidad: 0,01-10 µg/mL • LOD: 200- 5000 µg/mL (FID) <ul style="list-style-type: none"> • Linealidad: 10⁻⁵- 0,5 µg/mL • LOD: 1-20 µg/mL (MS)	Yang 1999 [75]
<ul style="list-style-type: none"> • Varios 	Varias matrices		<ul style="list-style-type: none"> • Revisión de varios artículos 		Beltrán 2000 [76]

PESTICIDAS	MUESTRA	TIPO DE FIBRA	CROMATOGRAFÍA	DATOS DE VALIDACIÓN	REFERENCIA
<ul style="list-style-type: none"> • Diclofentión • Metil paratión • Fenitrotión • Malatión • Fentión • Paratión • Metil bromofos • Etil bromofos • Fenamifos • Etión • Diazinón 	Agua	85 µm PA (DI-SPME)	GC/MS; GC/FTD	<ul style="list-style-type: none"> • Linealidad: 0,1-10 ng/mL • LOD: 0,01-0,07 ng/mL 	Lambropoulou 2000 [47]
<ul style="list-style-type: none"> • TEPP • Tionacina • Sulfotep • Forato • Disulfoton • Metil paratión • Paratión • Famfur 	Agua	<ul style="list-style-type: none"> • 100 µm PDMS • 85 µm PA (DI-SPME) 	GC/TSD	<ul style="list-style-type: none"> • Linealidad: 1-100 ng/mL 	Queiroz 2001 [48]

PESTICIDAS	MUESTRA	TIPO DE FIBRA	CROMATOGRAFÍA	DATOS DE VALIDACIÓN	REFERENCIA
<ul style="list-style-type: none"> • Diazinón • Metil paratión • Fenitrotión • Malatión • Fentión • Clorpirifos • Metidatión 	<p>Suero</p> <p>Orina</p>	<p>100 µm PDMS (DI-SPME)</p>	<p>GC/FPD</p>	<ul style="list-style-type: none"> • LOD: 1-15 ng/mL (suero) • LOD: 0,1-20 ng/mL (orina) 	<p>López 2001 [77]</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Clorfenvinfos 	<p>Avispas</p>	<p>100 µm PDMS (DI-SPME)</p>	<p>GC/ECD</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Linealidad: 0,07-15 ng/mL • LOD: 0,02 ng/mL 	<p>Alix 2001 [78]</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Diazinón • Fenitrotión • Fentión • Paratión • Metil bromofos • Etil bromofos • Ethion 	<p>Agua</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 100 µm PDMS • 85 µm PA (HS-SPME) 	<p>GC/FTD; GC/MS</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Linealidad: 0,05-1 ng/mL • LOD: 0,01-0,04 ng/mL 	<p>Lambropoulou 2001 [79]</p>

PESTICIDAS	MUESTRA	TIPO DE FIBRA	CROMATOGRAFÍA	DATOS DE VALIDACIÓN	REFERENCIA
<ul style="list-style-type: none"> • Bromofos • Clorpirifos • Coumafos • Diazinón • Fonofos • Heptenofos • Malatión • Metidatión • Paratión • Metil paratión • Fentoato • Fosalone • Fosmet • Etil pirimifos • Metil pirimifos • Pirazofos • Quinalfos • Triazofos 	Abejas	<ul style="list-style-type: none"> • 100 μm PDMS • 85 μm PA (DI-SPME) 	GC/NPD	<ul style="list-style-type: none"> • LOD: 1-10 ng/g 	Fernández 2001 [80]

PESTICIDAS	MUESTRA	TIPO DE FIBRA	CROMATOGRAFÍA	DATOS DE VALIDACIÓN	REFERENCIA
<ul style="list-style-type: none"> • Metil paratión • Clorpirifos • Carbofenotión • Metidatión 	Suelos	100 µm PDMS (DI-SPME)	GC/ECD	<ul style="list-style-type: none"> • Linealidad: 0,25-7,5 ng/mL (0,03-3,3 ng/mL; CLP) • LOD: 0,01-0,04 ng/mL 	Bouaid 2001 [81]
<ul style="list-style-type: none"> • Varios 	Varias matrices		<ul style="list-style-type: none"> • Compilación de varios artículos 		Supelco 2001 [82]
<ul style="list-style-type: none"> • Fonofos • Clorpirifos • Etión 	Sangre	85 µm PA (HS-SPME)	GC/MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Linealidad: 1-50 ng/mL • LOD: 0,2-0,7 ng/mL 	Hernández 2002 [83]
<ul style="list-style-type: none"> • Terbufos • Diazinón • Disulfoton • Metil paratión • Fenitrotión • Fentiión • Paratión • Metil bromofos • Etil bromofos • Ethion • Carbofurán 	Agua	100 µm PDMS (DI-SPME)	GC/MS; GC/FTD	<ul style="list-style-type: none"> • Linealidad: 0,05-10 ng/mL • LOD: 0,003-0,08 ng/mL (FTD) • LOD: 0,010-0,090 ng/mL (MS) 	Lambropoulou 2002 [84]

PESTICIDAS	MUESTRA	TIPO DE FIBRA	CROMATOGRAFÍA	DATOS DE VALIDACIÓN	REFERENCIA
<ul style="list-style-type: none"> • Clorfenvinfos • Diclorvos • Malatión • Paratión 	Agua	65 µm PDMS/DVB (DI-SPME)	GC/FPD; GC/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Linealidad: 0-25 ng/mL • LOD: 3-9 ng/mL 	Tomkins 2002 [85]
<ul style="list-style-type: none"> • Forato • Diazinon • Metil paratión • Fenitrotión • Malatión • Fentión • Paratión • Metidatión 	Agua Suelos	85 µm PA (DI-SPME)	GC/MS	<ul style="list-style-type: none"> • LOD: 1-10 pg/mL 	Zambonin 2002 [86]
<ul style="list-style-type: none"> • Diazinón • Paratión • Fenitrotión • Metil bromofos • Etil bromofos • Fentión • Etión 	Zumos	100 µm PDMS (HS-SPME)	GC/FTD; GC/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Linealidad: 0,5-50 ng/mL • LOD: 0,025-0,030 ng/mL • LOD: 0,030-0,050 ng/mL (FTD) (MS)	Lambropoulou 2002 [87]

PESTICIDAS	MUESTRA	TIPO DE FIBRA	CROMATOGRAFÍA	DATOS DE VALIDACIÓN	REFERENCIA
<ul style="list-style-type: none"> • Diazinon • Diclofentión • Metil paratión • Fenitrotión • Malatión • Fentión • Paratión • Metil bromofos • Etil bromofos • Ethion 	Agua	<ul style="list-style-type: none"> • 100 μm PDMS • 85 μm PA • 65 μm CW/DVB • 65 μm PDMS/DVB (DI-SPME) 	GC/FTD; GC/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Linealidad: 0,5-50 ng/mL • LOD: 2-80 pg/mL (FTD) • LOD: 7-90 pg/mL (MS) 	Lambropoulou 2002 [88]

PESTICIDAS	MUESTRA	TIPO DE FIBRA	CROMATOGRAFÍA	DATOS DE VALIDACIÓN	REFERENCIA
<ul style="list-style-type: none"> • Etil bromofos • Metil bromofos • Clorfenvinfos • Clorpirifos • Diazinón • Diclorvos • Disulfoton • Edifefos • Fentión • Malatión • Metidatión • Mevinfos • Paratión • Metil paratión • Quinalfos 	Sangre	100 µm PDMS (HS-SPME)	GC/MS	<ul style="list-style-type: none"> • Linealidad: 0,025-5 µg/g • LOD: 0,01-0,30 µg/g 	Musshoff 2002 [89]
<ul style="list-style-type: none"> • Metil paratión 	Sangre	85 µm PA (HS-SPME)	GC/NPD	<ul style="list-style-type: none"> • Linealidad: 0,1-40 µg/mL • LOD: 50 ng/mL 	Tsoukali 2004 [90]

PESTICIDAS	MUESTRA	TIPO DE FIBRA	CROMATOGRAFÍA	DATOS DE VALIDACIÓN	REFERENCIA
<ul style="list-style-type: none"> • Metil paratión • Diazinón • Paratión • Malatión 	<p>Sangre</p> <p>Hígado</p> <p>Riñón</p> <p>Plasma</p> <p>LCR</p>	<p>85 µm PA</p> <p>(HS-SPME)</p>	<p>GC/NPD</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Linealidad: 0,02-20 µg/mL ó (µg/g) • LOD: 3-55 ng/mL 	<p>Tsoukali 2005</p> <p>[91]</p>

Destacar finalmente, que todas estas técnicas de extracción son fácilmente automatizables, a excepción de la LLE, y se acoplan perfectamente a cualquier técnica cromatográfica, ya sea cromatografía en capa fina, cromatografía de gases o cromatografía líquida.

De hecho no hemos realizado la revisión en función de las técnicas cromatográficas ya que en la literatura especializada, aparecen numerosos artículos sobre la determinación de organofosforados con cualquiera de estas técnicas cromatográficas acoplada a diferentes detectores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Feigl F. Spot tests in organic analysis. Amsterdam: Elsevier Publishing Company; 1956.
- [2] Uges DRA. Hospital Toxicology. In Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, editors. Clarke's Analysis of drugs and poisons. London: Pharmaceutical Press; 2004, p. 3-36.
- [3] Sullivan JJ, Goh KS. Evaluation and validation of a commercial ELISA for diazinon in surface waters. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 4071-4078.
- [4] Watanabe E, Kanzaki Y, Tokumoto H, Hoshino R, Kubo H, Nakazawa H. Enzyme-linked immunosorbent assay based on a polyclonal antibody for the detection of the insecticide fenitrothion. Evaluation of antiserum and application to the analysis of water samples. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 53-58.
- [5] Brun EM, Garces-García M, Banuls MJ, Gabaldon JA, Puchades R, Maquieira A. Evaluation of a novel malathion immunoassay for groundwater and surface water analysis. *Environ Sci Technol* 2005; 39: 2786-2794.
- [6] Dalvie MA, Sinanovic E, London L, Cairncross E, Solomon A, Adam H. Cost analysis of ELISA, solid-phase extraction, and solid-phase microextraction for the monitoring of pesticides in water. *Environ Res* 2005; 98: 143-150.
- [7] Brun EM, Garces-García M, Puchades R, Maquieira A. Enzyme-linked immunosorbent assay for the organophosphorus insecticide fenthion. Influence of hapten structure. *J Immunol Methods* 2004; 295: 21-35.
- [8] Cho YA, Kim YJ, Hammock BD, Lee YT, Lee HS. Development of a microtiter plate ELISA and a dipstick ELISA for the determination of the organophosphorus insecticide fenthion. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 7854-7860.
- [9] Tewari SN, Ram L. Separation and identification of parathion and its metabolites in autopsy tissues by thin layer chromatography. *Mikrochim Acta* 1970; 58-60.

- [10] Machin AF, Quick MP, Waddell DF. The rapid determination of the organophosphorus pesticides diazinon and dichlorvos in blood by gas chromatography. *Analyst* 1973; 98: 176-180.
- [11] Ferreira JR, Fernandes AM. Gas-liquid chromatographic determination of organophosphorus insecticide residues in fruits and vegetables. *J Assoc Off Anal Chem* 1980; 63: 517-522.
- [12] Lawrence JF, Iverson F. Analysis of the diazinon metabolites G 27550 and GS 31144 by gas-liquid chromatography with nitrogen-specific detection after derivatization. *J Chromatogr* 1975; 103: 341-347.
- [13] Suzuki O, Watanabe K. *Drugs and poisons in humans. A handbook of practical analysis.* Berlin: Springer-Verlag; 2005.
- [14] Reid SJ, Watts RR. A method for the determination of dialkyl phosphate residues in urine. *J Anal Toxicol* 1981; 5: 126-132.
- [15] Bravo R, Driskell WJ, Whitehead RD, Needham LL, Barr DB. Quantitation of dialkyl phosphate metabolites of organophosphate pesticides in human urine using GC-MS-MS with isotopic internal standards. *J Anal Toxicol* 2002; 26: 245-252.
- [16] Johansson CE. A multiresidue analytical method for determining organochlorine, organophosphorus, dinitrophenyl and carbamate pesticides in apples. *Pestic Sci* 1978; 9: 313-322.
- [17] Wood AB, Kanagasabapathy L. Evaluation of inexpensive thin-layer chromatographic procedures for the estimation of some organophosphorus and carbamate insecticide residues in fruit and vegetables. *Pestic Sci* 1983; 14: 108-118.
- [18] Singh AK, Hewetson DW, Jordon KC, Ashraf M. Analysis of organophosphorus insecticides in biological samples by selective ion monitoring gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 1986; 369: 83-96.

- [19] Brzak KA, Harms DW, Bartels MJ, Nolan RJ. Determination of chlorpyrifos, chlorpyrifos oxon, and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in rat and human blood. *J Anal Toxicol* 1998; 22: 203-210.
- [20] Kuivinen J, Bengtsson S. Solid-phase extraction and cleanup of organophosphorus pesticide residues in bovine muscle with gas chromatographic detection. *J Chromatogr Sci* 2002; 40: 392-396.
- [21] Mol HG, van Dam RC, Steijger OM. Determination of polar organophosphorus pesticides in vegetables and fruits using liquid chromatography with tandem mass spectrometry: selection of extraction solvent. *J Chromatogr A* 2003; 1015: 119-127.
- [22] Bardarov V, Mitewa M. High-performance liquid and gas chromatography of dialkylphosphates, dialkylthiophosphates and dialkyldithiophosphates as their pentafluorobenzyl derivatives. *J Chromatogr* 1989; 462: 233-241.
- [23] Wan H. Small-scale method for the determination of organophosphorus insecticides in tea using sulphuric acid as clean-up reagent. *J Chromatogr* 1990; 516: 446-449.
- [24] Sharma VK, Jadhav RK, Rao GJ, Saraf AK, Chandra H. High performance liquid chromatographic method for the analysis of organophosphorus and carbamate pesticides. *Forensic Sci Int* 1990; 48: 21-25.
- [25] Moriya F, Hashimoto Y, Li-Kuo T. Pitfalls when determining tissue distributions of organophosphorus chemicals: sodium fluoride accelerates chemical degradation. *J Anal Toxicol* 1999; 23: 210-215.
- [26] Moriya F, Hashimoto Y. Comparative studies on tissue distributions of organophosphorus, carbamate and organochlorine pesticides in decedents intoxicated with these chemicals. *J Forensic Sci* 1999; 44: 1131-1135.

- [27] Martínez MA, Ballesteros S, Sánchez de la Torre C, Sanchiz A, Almarza E, García-Aguilera A. Attempted suicide by ingestion of chlorpyrifos: identification in serum and gastric content by GC-FID/GC-MS. *J Anal Toxicol* 2004; 28: 609-615.
- [28] Thompson TS, Treble RG, Magliocco A, Roettger JR, Eichhorst JC. Case study: fatal poisoning by malathion. *Forensic Sci Int* 1998; 95: 89-98.
- [29] Tarbah FA, Kardel B, Pier S, Temme O, Daldrup T. Acute poisoning with phosphamidon: determination of dimethyl phosphate (DMP) as a stable metabolite in a case organophosphate insecticide intoxication. *J Anal Toxicol* 2004; 28: 198-203.
- [30] Kupfermann N, Schmoldt A, Steinhart H. Rapid and sensitive quantitative analysis of alkyl phosphates in urine after organophosphate poisoning. *J Anal Toxicol* 2004; 28: 242-248.
- [31] Liu S, Pleil JD. Human blood and environmental media screening method for pesticides and polychlorinated biphenyl compounds using liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry analysis. *J Chromatogr B* 2002; 769: 155-167.
- [32] Pitarch E, López FJ, Serrano R, Hernández F. Multiresidue determination of organophosphorous and organochlorine pesticides in human biological fluids by capillary gas chromatography. *Fresenius J Anal Chem* 2001; 369: 502-509.
- [33] Futagami K, Narazaki C, Kataoka Y, Shuto H, Oishi R. Application of high-performance thin-layer chromatography for the detection of organophosphorus insecticides in human serum after acute poisoning. *J Chromatogr B* 1997; 704: 369-373.
- [34] Oliva J, Barba A, Vela N, Melendreras F, Navarro S. Multiresidue method for the rapid determination of organophosphorus insecticides in grapes, must and wine. *J Chromatogr A* 2000; 882: 213-220.

- [35] Fernández M, Picó Y, Girotti S, Manes J. Analysis of organophosphorus pesticides in honeybee by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 3540-3547.
- [36] Kawata K, Asada T, Oikawa K. Determination of pesticides in compost by pressurized liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2005; 1090: 10-15.
- [37] Thapar S, Bhushan R, Mathur RP. Simultaneous determination of a mixture of organophosphorus and carbamate pesticides by high performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 1994; 8: 153-157.
- [38] Thurman EM, Mills MS. Solid-phase extraction: Principles and practice. New York: John Wiley & Sons, INC; 1998.
- [39] Franke JP, de Zeeuw R. Solid-phase extraction procedures in systematic toxicological analysis. *J Chromatogr B* 1998; 713: 51-59.
- [40] Liu J, Suzuki O, Kumazawa T, Seno H. Rapid isolation with Sep-Pak C₁₈ cartridges and wide-bore capillary gas chromatography of organophosphate pesticides. *Forensic Sci Int* 1989; 41: 67-72.
- [41] Oneto ML, Basack SB, Kesten EM. Total and conjugated urinary paranitrophenol after an acute parathion ingestion. *Sci Justice* 1995; 35(3): 207-211.
- [42] Meyer E, Borrey D, Lambert W, Van Peteghem C, Piette M, De Leenheer A. Analysis of fenthion in postmortem samples by HPLC with diode-array detection and GC-MS using solid-phase extraction. *J Anal Toxicol* 1998; 22: 248-252.
- [43] Riley MB, Dumas JA, Gbur EE, Massey JH, Mattice JD, Mersie W, et al. Pesticide extraction efficiency of two solid phase disk types after shipping. *J Agric Food Chem* 2005; 53 (13): 5079-5083.
- [44] Ballesteros E, Parrado MJ. Continuous solid-phase extraction and gas chromatographic determination of organophosphorus pesticides in natural and drinking waters. *J Chromatogr A* 2004; 1029 (1-2): 267-273.

- [45] Blasco C, Fernández M, Pena A, Lino C, Silveira MI, Font G, et al. Assessment of pesticide residues in honey samples from Portugal and Spain. *J Agric Food Chem* 2003; 51 (27): 8132-8138.
- [46] Lacorte S, Barceló D. Determination of organophosphorus pesticides and their transformation products in river waters by automated on-line solid-phase extraction followed by thermospray liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1995; 712 (1): 103-112.
- [47] Lambropoulou D, Sakellarides T, Albanis T. Determination of organophosphorus insecticides in natural waters using SPE-disks and SPME followed by GC/FTD and GC/MS. *Fresenius J Anal Chem* 2000; 368: 616-623.
- [48] Queiroz MEC, Silva SM, Carvalho D, Lanças FM. Comparison between solid-phase extraction methods for the chromatographic determination of organophosphorus pesticides in water. *J Environ Sci Health* 2001; B36: 517-527.
- [49] Abu-Qare AW, Abou-Donia MB. Determination of diazinon, chlorpyrifos, and their metabolites in rat plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr Sci* 2001; 39: 200-204.
- [50] García-Repetto R, Giménez MP, Repetto M. New method for determination of ten pesticides in human blood. *J AOAC Int* 2001; 84(2): 342-349.
- [51] Beike J, Ortmann Ch, Meiners Th, Brinkmann B, Köhler H. LC-MS determination of oxydemeton-methyl and its main metabolite demeton-s-methylsulfon in biological specimens-application to a forensic case. *J Anal Toxicol* 2002; 26: 308-312.
- [52] Barr DB, Barr JR, Maggio VL, Whitehead RD, Sadowski MA, Whyatt RM, et al. A multi-analyte method for the quantification of contemporary pesticides in human serum and plasma using high-resolution mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2002; 778: 99-111.

- [53] Frenzel T, Sochor H, Speer K, Uihlein M. Rapid multimethod for verification and determination of toxic pesticides in whole blood by means of capillary GC-MS. *J Anal Toxicol* 2000; 24: 365-371.
- [54] Kojima T, Yashiki M, Ohtani M, Chikasue F, Miyazaki T. Determination of dimethoate in blood and hemoperfusion cartridge following ingestion of formothion: a case study. *Forensic Sci Int* 1990; 48: 79-88.
- [55] Pavlic N, Haidekker A, Grubwieser P, Rabl W. Fatal intoxication with omethoate. *Int J Legal Med* 2002; 116: 238-241.
- [56] Wong JW, Webster MG, Halverson CA, Hengel MJ, Ngim KK, Ebeler SE. Multiresidue pesticide analysis in wines by solid-phase extraction and capillary gas chromatography-mass spectrometric detection with selective ion monitoring. *J Agric Food Chem* 2003; 51(5): 1148-1161.
- [57] Yokley RA, Shen N, Cheung MW. Determination of two oxy-pyrimidine metabolites of diazinon by gas chromatography/mass selective detection and liquid chromatography/electrospray ionization/mass spectrometry/mass spectrometry. *J AOAC Int* 2000; 83(5): 1229-1238.
- [58] Molina C, Grasso P, Benfenati E, Barceló D. Automated sample preparation with extraction columns following by liquid chromatography-ionspray mass spectrometry. Interferences, determination and degradation of polar organophosphorus pesticides in water samples. *J Chromatogr A* 1996; 737: 47-58.
- [59] Ingelse BA, van Dam RCJ, Vreeken RJ, Mol HGJ, Steijger OM. Determination of polar organophosphorus pesticides in aqueous samples by direct injection using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2001; 918: 67-78.
- [60] Olsson AO, Baker SE, Nguyen JV, Romanoff LC, Udunka SO, Walker RD, et al. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry multiresidue method for quantification of specific metabolites of organophosphorus pesticides, synthetic

pyrethroids, selected herbicides, and DEET in human urine. *Anal Chem* 2004; 76(9): 2453-2461.

[61] 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* 2002; 982: 267-273.

[62] Ferrer C, Gómez MJ, García-Reyes JF, Ferrer I, Thurman EM, Fernández-Alba AR. Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2005; 1069 (2): 183-194.

[63] 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* 2003; 51 (24): 6915-6921.

[64] Di Muccio A, Pelosi P, Camoni I, Barbini A, Dommarco R, Generali T, et al. Selective, solid-matrix dispersion extraction of organophosphate pesticide residues from milk. *J Chromatogr A* 1996; 754: 497-506.

[65] Torres CM, Picó Y, Marín R, Mañes J. Evaluation of organophosphorus pesticide residues in citrus fruits from the Valencian Community (Spain). *J AOAC Int* 1997; 80: 1122-1128.

[66] Shirey R, *The Reporter* (Supelco); Volume 16, nº 5; 1997. Página 6; Field sampling for pesticides, using solid phase microextraction/capillary GC.

[67] Application note 143; 1997; Supelco; Field sampling for pesticides, using solid phase microextraction/capillary GC.

[68] Namera A, Yashiki M, Nagasawa N, Iwasaki Y, Kojima T. Rapid analysis of malathion in blood using headspace-solid phase microextraction and selected ion monitoring. *Forensic Sci Int* 1997; 88: 125-131.

[69] Sng MT, Lee FK, Lakso HÅ. Solid-phase microextraction of organophosphorus pesticides from water. *J Chromatogr A* 1997; 759: 225-230.

- [70] Beltrán J, López FJ, Cepria O, Hernández, F. Solid-phase microextraction for quantitative analysis of organophosphorus pesticides in environmental water samples. *J Chromatogr A* 1998; 808: 257-263.
- [71] Application note 94; 1999; Supelco; Solid-phase microextraction of organophosphate insecticides and analysis by capillary GC/MS.
- [72] Musshoff F, Junker H, Madea B. Rapid analysis of paration in biological samples using headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 639-642.
- [73] Simplício AL, Boas LV. Validation of a solid-phase microextraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice. *J Chromatogr A* 1999; 833: 35-42.
- [74] Hu R, Hennion B, Urruty L, Montury M. Solid phase microextraction of pesticide residues from strawberries. *Food Addit Contam* 1999; 16: 111-117.
- [75] Yang KW, Eisert R, Lord H, Pawliszyn J. Determination of pesticides in foods by automated SPME-GC-MS. In Pawliszyn J. *Applications of Solid phase microextraction*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 1999, 435-447.
- [76] Beltrán J, López FJ, Hernández F. Review: Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis. *J Chromatogr A* 2000; 885: 389-404.
- [77] López FJ, Pitarch E, Egea S, Beltrán J, Hernández F. Gas chromatographic determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in human fluids using solid phase microextraction. *Anal Chim Acta* 2001; 433: 217-226.
- [78] Alix A, Collot D, Nénon JP, Anger JP. Measurement of insecticide uptake and effective fraction in a beneficial insect using solid-phase microextraction. *Anal Chem* 2001; 73: 3107-3111.
- [79] Lambropoulou DA, Albanis T. Optimization of headspace solid-phase microextraction conditions for the determination of organophosphorus insecticides in natural waters. *J Chromatogr A* 2001; 922: 243-255.

- [80] Fernández M, Padrón C, Marconi L, Ghini S, Colombo R, Sabatini AG, et al. Determination of organophosphorus pesticides in honeybees after solid-phase microextraction. *J Chromatogr A* 2001; 922: 257-265.
- [81] Bouaid A, Ramos L, González MJ, Fernández P, Cámara C. Solid-phase microextraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in soil samples by gas chromatography. *J Chromatogr A* 2001; 939: 13-21.
- [82] Supelco. SPME Applications guide. 3rd ed. Bulletin 925 B [documento online] 2001 [consultado en 2002 Feb 2]. Disponible en: URL: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/8700/8652.pdf>
- [83] Hernández F, Pitarch E, Beltrán J, López FJ. Headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and tandem mass spectrometry for the determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in whole human blood. *J Chromatogr B* 2002; 769: 65-77.
- [84] Lambropoulou DA, Sakkas A, Hela DG, Albanis T. Application of solid-phase microextraction in the monitoring of priority pesticides in the Kalamas river (N.W. Greece). *J Chromatogr A* 2002; 963: 107-116.
- [85] Tomkins BA, Ilgner RH. Determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in ground water using solid-phase microextraction (SPME) followed by gas chromatography with selected-ion monitoring. *J Chromatogr A* 2002; 972: 183-194.
- [86] Zambonin CG, Losito I, Cilenti A, Palmesano F. Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the study of soil adsorption coefficients of organophosphorus pesticides. *J Environ Monit* 2002; 2002: 477-481.
- [87] Lambropoulou DA, Albanis TA. Headspace solid phase microextraction applied to the analysis of organophosphorus insecticides in strawberry and cherry juices. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 3359-3365.

- [88] Lambropoulou DA, Sakkas VA, Albanis TA. Validation of an SPME method, using PDMS, PA, PDMS-DVB, and CW-DVB fiber coatings, for analysis of organophosphorus insecticides in natural waters. *Anal Bioanal Chem* 2002; 374: 932-941.
- [89] Musshoff F, Junker H, Madea B. Simple determination of 22 organophosphorous pesticides in human blood using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J Chromatogr Sci* 2002; 40: 29-34.
- [90] Tsoukali H, Raikos N, Theodoridis G, Psaroulis D. Headspace solid phase microextraction for the gas chromatographic analysis of methyl-parathion in post-mortem human samples. Application in a suicide case by intravenous injection. *Forensic Sci Int* 2004; 143: 127-132.
- [91] Tsoukali H, Theodoridis G, Raikos N, Grigoratou I. Solid phase microextraction gas chromatographic analysis of organophosphorus pesticides in biological samples. *J Chromatogr B* 2005; 822: 194-200.

CAPÍTULO III

MICROEXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA

CAPÍTULO III. MICROEXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA

1. Introdução	83
2. Fundamento Teórico	85
3. Modos de Extracção	88
Imersão Directa	88
Extracção por <i>Headspace</i>	88
Extracção por Membrana	89
4. Optimização do Processo de Extracção	90
Revestimento da Fibra	91
Agitação da Amostra	91
Tempo de Extracção	92
Tempo de Desorção	93
Programa de Temperaturas do GC	94
Temperatura	94
Volume de Amostra e de <i>Headspace</i>	95
pH	95
Adição de sais	96
5. Aplicações	97
Análises Ambientais	97
Análise de Alimentos	97
Aplicações Farmacêuticas	98
Aplicações Clínicas e Forenses	98
Outras Aplicações	98
Referências Bibliográficas	99

1. INTRODUÇÃO

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica de adsorção/desorção desenvolvida a princípios da década de 90 na Universidade de Waterloo (Ontário, Canadá) por Arthur e Pawliszyn [1, 2], com o objectivo de facilitar a preparação da amostra, já que as técnicas normalmente utilizadas para este fim, como a extração líquido-líquido e sólido-líquido, apresentam vários inconvenientes, como o tempo excessivo de preparação e a necessidade de solventes orgânicos [3-5].

É uma técnica rápida e de fácil manejo, que não necessita de equipamentos complicados e pode ser usada para concentrar compostos voláteis e não voláteis em amostras líquidas ou gasosas, permitindo obter resultados lineares e reprodutíveis dentro de um amplo intervalo de concentrações [3-7]. Além disso, é perfeitamente acoplável à cromatografia gasosa com qualquer tipo de detector ou a sistemas de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) [3, 5, 7].

Embora inicialmente direccionada para a determinação de compostos orgânicos no meio ambiente, as suas vantagens nas análises clínicas, forenses e de alimentos foram sendo postas em evidência [1].

A SPME consiste basicamente numa fibra capilar de sílica fundida coberta por uma fase estacionária (polímero). A fibra está unida a uma agulha de aço inoxidável que permite o seu movimento e a protege durante os processos de extração e desorção. Na Figura 6 está representado o dispositivo de SPME.

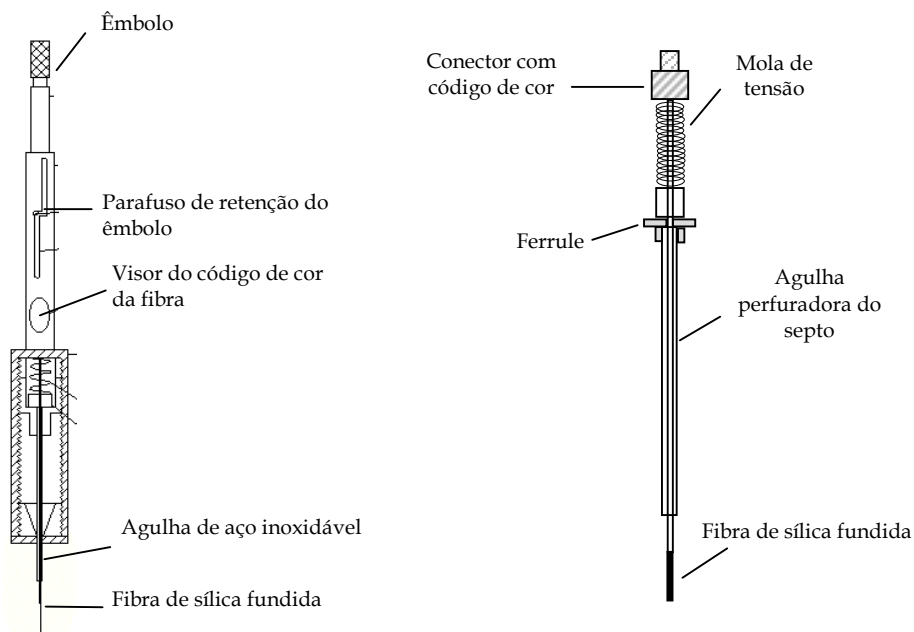


Figura 6: Suporte manual de SPME e detalhe de uma fibra.

A composição do revestimento da fibra pode variar, consoante o(s) analito(s) que se pretende(m) extrair [1, 7, 8], estando disponíveis vários tipos de fibras revestidas (Tabela 3):

Tabela 3: Características dos diferentes tipos de fibras disponíveis no mercado.

TIPO DE FIBRA	ESPESSURA (μm)	TEMPERATURA DE TRABALHO ($^{\circ}\text{C}$)
Polidimetilsiloxano (PDMS)	7	200-280
	30	
	100	220-320
PDMS-Divinilbenzeno (PDMS/DVB)	60	HPLC
	65	200-270
Poliacrilato (PA)	85	220-310
Carboxen TM /PDMS (CAR/PDMS)	75	
	85	250-310
Carbowax [®] /DVB (CW/DVB)	65	
	70	200-250
CW/Templated resin (CW/TPR)	50	HPLC
DVB/CAR/PDMS	50/30	230-270

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

Tal como se referiu anteriormente, a SPME é uma técnica de adsorção/desorção, na qual os analitos são adsorvidos no revestimento de uma fibra e posteriormente desorvidos no injetor de um sistema cromatográfico.

Esta técnica baseia-se em fundamentos de termodinâmica e transferência de massa e, contrariamente a outros métodos de extração, toda a quantidade de analito extraída é introduzida no sistema cromatográfico [1].

O procedimento de extração é simples. Em primeiro lugar deve perfurar-se o septo do vial onde se encontra a amostra e, com o suporte de SPME dentro do vial, a fibra é empurrada para o exterior da agulha de aço inoxidável, colocando-a em contacto com a amostra ou com o espaço que há entre a amostra e o septo (*headspace*). Os analitos são então adsorvidos no revestimento da fibra e, após alcançado o equilíbrio de adsorção, esta é recolhida para o interior da agulha, sendo o dispositivo retirado de dentro do vial. Finalmente, a agulha é introduzida no injetor do sistema cromatográfico, onde ocorre a desorção térmica dos analitos, sendo estes libertados na coluna do cromatógrafo de gases ou na interface SPME/HPLC (Figura 7).

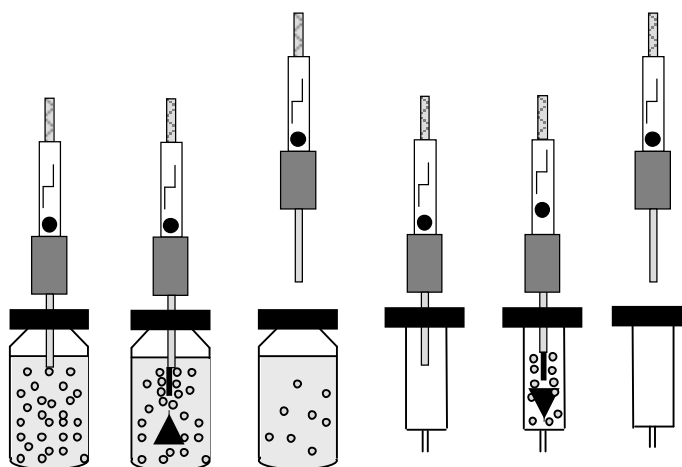


Figura 7: Etapas do processo de microextração em fase sólida.

Os resultados são comparáveis aos obtidos com outras metodologias. Na SPME, o equilíbrio é estabelecido entre a concentração de analito na amostra, no *headspace* e no polímero que cobre a fibra [7].

O transporte dos analitos da matriz para o revestimento da fibra inicia-se no momento em que esta é colocada em contacto com a amostra. Normalmente, a extração considera-se completa quando a concentração de analito atinge o equilíbrio de distribuição entre a matriz e o revestimento da fibra. Na prática, a partir do momento em que o equilíbrio é atingido, a quantidade extraída é constante dentro dos limites do erro experimental, sendo independente de aumentos adicionais no tempo de extração. As condições de equilíbrio podem ser descritas como:

$$n = \frac{K_{fs} \times V_f \times V_s \times C_0}{K_{fs} \times V_f + V_s} \quad (1)$$

Nesta equação, **n** representa a massa de analito extraída pelo revestimento da fibra; **C₀** a concentração inicial do analito na amostra; **K_{fs}** a constante de distribuição entre a fibra e a amostra; **V_s** o volume da amostra e **V_f** o volume do revestimento da fibra.

Esta equação demonstra que existe uma relação directamente proporcional entre a concentração inicial de analito na amostra e a quantidade de analito extraída, sendo esta relação a base para a quantificação do analito.

A SPME é uma técnica de equilíbrio, não extraíndo exaustivamente os analitos. A extração completa só é conseguida nos casos em que a constante de distribuição (**K_{fs}**) é consideravelmente grande e o volume da amostra (**V_s**) bastante pequeno. Quando o volume de amostra é muito grande (**K_{fs} × V_f << V_s**), a equação anterior pode ser simplificada:

$$n = K_{fs} \times V_f \times C_0 \quad (2)$$

Nesta equação a quantidade de analito extraída pela fibra corresponde directamente à sua concentração na matriz, sendo independente do volume da amostra, o que torna óbvia a utilidade desta técnica para aplicações de campo. Na prática, não será necessário definir um volume de amostra a recolher antes da análise, já que a fibra pode ser exposta directamente ao ar, água, etc. Ao eliminar o procedimento de amostragem, todo o processo analítico pode ser acelerado, e os erros associados à perda do analito por decomposição ou adsorção nas paredes do vial são minimizados.

As duas equações referidas anteriormente indicam que a eficiência do processo extractivo é dependente da constante de distribuição, sendo este um parâmetro característico que descreve as propriedades de um revestimento e a sua selectividade face a um determinado analito, em detrimento de outras substâncias presentes na matriz.

Até agora temos considerado a SPME como um processo de equilíbrio entre duas fases, mas na realidade trata-se de um equilíbrio entre várias fases. Para simplificar consideram-se apenas três fases: o revestimento da fibra, o *headspace* e uma matriz homogénea. A massa de analito extraída pela fibra pode ser representada por:

$$n = \frac{K_{fs} \times V_f \times V_s \times C_0}{K_{fs} \times V_f + K_{hs} \times V_h + V_s} \quad (3)$$

Nesta equação, n representa a massa de analito adsorvida pela fibra; C_0 a sua concentração inicial na amostra; K_{fs} e K_{hs} são respectivamente as constantes de

distribuição em relação à amostra da fibra e do *headspace*; V_f , V_h e V_s são os volumes da fibra, *headspace* e amostra respectivamente.

A equação estabelece que, em condições de equilíbrio, a quantidade de analito extraída é independente da localização da fibra no sistema, podendo ser colocada no *headspace* ou directamente na amostra, desde que os volumes do revestimento da fibra, do *headspace* e da amostra se mantenham constantes.

3. MODOS DE EXTRACÇÃO

Em SPME é possível extrair de três modos distintos: por imersão directa (DI-SPME), por *headspace* (HS-SPME) e por membrana.

IMERSÃO DIRECTA

Neste modo de extração a fibra é posta directamente em contacto com a amostra e os analitos distribuem-se entre a matriz e a fase extractiva. Para tornar a extração mais rápida é frequentemente necessário agitar a amostra, uma vez que o contacto entre os analitos e o revestimento da fibra é, deste modo, facilitado. É ideal para a extração de analitos pouco voláteis e matrizes pouco sujas.

EXTRACÇÃO POR HEADSPACE

Neste tipo de extração, os analitos necessitam de ser volatilizados antes de serem adsorvidos pelo revestimento da fibra, estando esta em contacto com o *headspace* e não com a amostra. Deste modo protege-se a fibra de interferentes pouco voláteis e substâncias de alto peso molecular (como por exemplo as proteínas) eventualmente presentes na matriz. É possível ainda levar a cabo modificações da amostra, como por exemplo no seu pH, sem danificar a fibra,

prolongando-se assim a sua vida média. Este modo de extracção é ideal para analitos voláteis.

A escolha do modo de amostragem tem um impacto muito significativo na cinética de extracção. Quando a fibra se encontra no *headspace*, os analitos são daqui removidos em primeiro lugar, seguindo-se uma extracção indirecta a partir da matriz. Deste modo, os analitos voláteis serão extraídos mais depressa que os semivoláteis, já que a sua concentração no *headspace* será maior.

A temperatura também tem um efeito importante na cinética do processo, já que determina a pressão de vapor dos analitos. De facto, o tempo de equilíbrio para voláteis é menor na extracção por *headspace* que por imersão directa quando se aplicam as mesmas condições de agitação, o que se deve a dois factores: uma porção significativa dos analitos encontra-se no *headspace* antes da extracção, e os coeficientes de difusão são maiores na fase gasosa que no meio líquido. Uma vez que a concentração de semivoláteis na fase gasosa é pequena à temperatura ambiente, as velocidades de transferência de massa também serão mais pequenas, resultando em tempos de extracção mais longos. Estes tempos podem ser melhorados quer por intermédio de uma agitação muito eficiente, quer por um aumento da temperatura de extracção.

EXTRACÇÃO POR MEMBRANA

Similar à imersão directa, diferindo apenas no facto da fibra se encontrar protegida por uma membrana semipermeável, prolongando assim a sua vida média. Este tipo de extracção está indicado para matrizes sujas nos casos em que a extracção por *headspace* não é possível (analitos muito pouco voláteis).

Além disso, uma membrana feita de material apropriado pode proporcionar um certo grau de selectividade ao processo extractivo. No entanto, a cinética deste modo de extracção é substancialmente mais lenta que na imersão directa, uma

vez que os analitos têm de difundir-se através da membrana antes de chegar ao revestimento da fibra [1]. A extração pode ser mais rápida pelo uso de membranas pouco espessas e temperaturas de extração mais elevadas.

Na Figura 8 estão representados esquematicamente os três modos de extração descritos anteriormente.

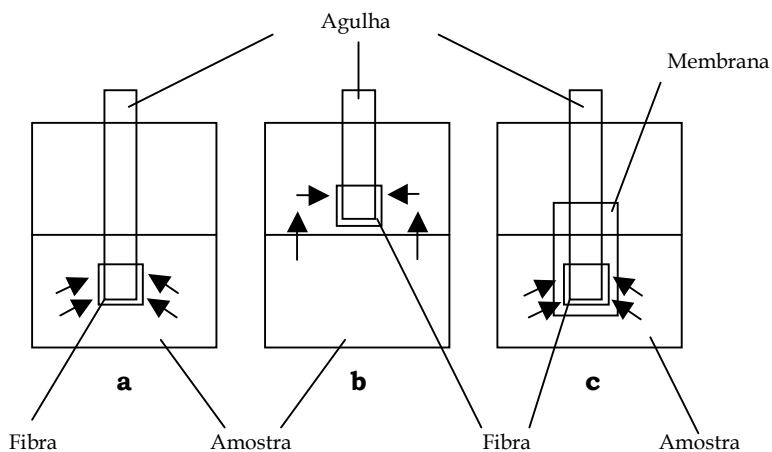


Figura 8: Modos de extração: (a) imersão directa, (b) extração por *headspace*, (c) extração por membrana.

4. OPTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO

Para obter uma boa reprodutibilidade e rendimento no processo de SPME, há vários parâmetros que devem ser otimizados, já que a extração dos analitos nunca é completa. Entre estes parâmetros incluem-se a polaridade, espessura e tipo de revestimento da fibra, agitação da amostra, pH, força iónica, volume da amostra e temperatura.

REVESTIMENTO DA FIBRA

O tipo de revestimento da fibra pode ser escolhido consoante a polaridade do analito que se pretende extrair. Assim, analitos pouco polares terão maior afinidade para revestimentos pouco polares, ao passo que analitos mais polares serão adsorvidos preferencialmente por um revestimento polar [9].

A espessura da fase estacionária determina a sensibilidade do método, aumentando a quantidade de analito adsorvido com o aumento da espessura. No entanto, o tempo de extração também é afectado por este parâmetro, sendo as cinéticas de extração mais lentas à medida que a espessura da fibra aumenta, o que leva a tempos de extração mais longos. Deste modo, deverá ser escolhido o revestimento mais fino que permita atingir os limites de detecção pretendidos.

Em geral, compostos voláteis necessitam de uma espessura maior no revestimento da fibra, ao passo que se recomendam menores espessuras para analitos semivoláteis.

Como exemplo de revestimentos temos o PDMS e o CW/DVD, sendo o primeiro usado para a extração de analitos apolares ou pouco polares e o segundo para analitos mais polares.

AGITAÇÃO DA AMOSTRA

A eficácia da técnica de agitação determina os tempos de equilíbrio em amostras aquosas. A influência deste parâmetro depende do modo de extração. De um modo geral, a agitação da amostra aumentará a quantidade de analito extraída e reduzirá o tempo de extração, principalmente para analitos de maior peso molecular e com altos coeficientes de difusão. O uso de ultra-sons promove a adsorção do analito, mas pode aquecer a amostra, o que não é desejável para

analitos sensíveis ao calor. Por outro lado, este aquecimento pode ser útil para vaporizar os analitos na extração por *headspace*.

O tempo de equilíbrio para a análise de amostras gasosas é curto, estando unicamente limitado pela difusão dos analitos através da fibra. Uma situação similar ocorre quando se analisam compostos muito voláteis por HS-SPME. Nesta situação, a maioria dos analitos encontra-se no *headspace*, dando lugar a extracções relativamente rápidas, mesmo sem agitação. No entanto, na maior parte dos casos é conveniente agitar o sistema para facilitar o transporte de massa entre a amostra e a fibra, acelerando a cinética do processo. Contudo, uma agitação inconsistente origina uma pior precisão, sendo inclusivamente pior que não agitar.

TEMPO DE EXTRACÇÃO

O tempo de extração depende do tamanho dos analitos, do revestimento da fibra e do tipo de extração utilizado, entre outros factores. Normalmente os tempos de extração são curtos para analitos de pequeno tamanho, quando se utilizam fibras com revestimento menos espesso, ou ainda quando se usa a extração por *headspace*.

Em princípio, o objectivo da SPME é alcançar o equilíbrio de distribuição no sistema. O tempo de equilíbrio é definido como o tempo a partir do qual a quantidade de analito extraída permanece constante e corresponde, dentro do erro experimental, à quantidade extraída num tempo de extração infinito [1]. Deverá ter-se cuidado quando se determina o tempo de equilíbrio, uma vez que em alguns casos uma redução significativa do declive pode ser erradamente interpretada como o ponto de equilíbrio. Isto assume particular importância na SPME por *headspace*, na qual o aumento rápido da curva de equilíbrio, que corresponde à extração a partir da fase gasosa, é seguido por um aumento muito

lento relacionado com a transferência de analito a partir da amostra para a fibra através da fase gasosa.

Os tempos de equilíbrio em análises biomédicas podem ser muito longos, estando descritos alguns métodos nos quais, por razões práticas, foram escolhidos tempos de extração consideravelmente menores que o tempo de equilíbrio. Isto é possível porque a SPME é um método quantitativo para qualquer tempo de extração, podendo obter-se suficiente sensibilidade antes de atingir o tempo de equilíbrio [9].

No entanto, no caso de se utilizar um tempo de extração mais curto que o tempo de equilíbrio, este deverá ser cuidadosamente controlado, já que pequenas alterações poderão conduzir a grandes erros experimentais [1].

TEMPO DE DESORÇÃO

O tempo de desorção é determinado pela temperatura do injector e pela velocidade de fluxo à volta da fibra. Os tempos teóricos de desorção são muito curtos, uma vez que o coeficiente de difusão dos analitos no revestimento aumenta e a constante de distribuição gás/fibra decresce rapidamente com o aumento da temperatura. Para velocidades de fluxo maiores, a temperatura do injector poderá ser reduzida substancialmente, uma vez que a partição dos analitos na fase gasosa não necessita de ser total para que estes sejam rápida e exaustivamente removidos do revestimento.

O tempo de desorção deverá ser o mais curto possível e os eventuais efeitos de arrastamento de analito de uma análise para outra (*carry-over*) devem ser excluídos. O tempo ideal de desorção deve ser obtido experimentalmente, usando-se como temperatura do injector a maior possível, desde que não danifique o revestimento da fibra. Após a introdução da agulha no injector, a exposição da fibra deverá ser feita rapidamente, para evitar que a desorção

ocorra dentro da agulha, o que poderia levar a que os picos saíssem dobrados. Para além do analito, também deverá ser considerado o *carry-over* de constituintes da matriz, já que pode haver acumulação de interferentes no revestimento que, se não forem notados, podem conduzir a erros na determinação [9].

PROGRAMA DE TEMPERATURAS DO GC

O programa de temperaturas do GC é determinado pela necessidade de condensação dos analitos à cabeça da coluna, para evitar o alargamento de picos provocado pela injeção muito lenta, consequência do longo tempo de desorção. Assim, começa normalmente a uma temperatura consideravelmente menor que a temperatura de desorção, devendo ser suficientemente baixa para promover a condensação dos analitos.

TEMPERATURA

Este parâmetro tem um efeito significativo, tanto na selectividade e sensibilidade como na cinética de extração. Ao aumentar a temperatura, aumenta também a velocidade de extração, mas a constante de distribuição entre a fibra e a amostra será mais pequena, originando uma perda de sensibilidade.

Do ponto de vista cinético, um aumento na temperatura de extração produz um aumento dos coeficientes de difusão e uma diminuição das constantes de distribuição, conduzindo a um tempo de equilíbrio mais curto. Assim, os tempos de extração serão mais curtos, mas a sensibilidade no equilíbrio será menor.

VOLUME DE AMOSTRA E DE HEADSPACE

A sensibilidade do método é proporcional à quantidade de analito extraído da amostra. Como já referimos anteriormente, para a extração por imersão directa (Equação 1), à medida que o volume de amostra aumenta, aumenta também a quantidade de analito extraída. Para volumes de amostra suficientemente elevados, a quantidade de analito extraída dependerá exclusivamente da constante de distribuição, do volume da fibra e da concentração inicial, sendo independente do volume de amostra (Equação 2).

Os compostos muito voláteis concentram-se preferencialmente no *headspace*, dando lugar a uma perda substancial da sensibilidade quando o volume deste é grande.

Deste modo, para aumentar a sensibilidade do método, o volume do *headspace* deverá ser mínimo, tanto na DI-SPME como na HS-SPME.

pH

O pH da amostra afecta o equilíbrio de dissociação em meio aquoso, sendo a extração mais eficaz quando os analitos estão na forma não dissociada. Por exemplo, uma diminuição de pH resulta num aumento da concentração da espécie neutra dos compostos ácidos presentes na amostra, aumentando deste modo a quantidade extraída pela fibra. A mesma situação ocorre para os compostos básicos quando se aumenta o pH. Para que todo o analito se encontre na forma neutra, o pH deverá estar ajustado pelo menos duas unidades abaixo do seu pKa no caso de analitos ácidos, e pelo menos duas unidades acima do pKa para analitos básicos. A optimização do pH deve ser verificada experimentalmente, já que a adição de um tampão à amostra modifica a matriz, o que resulta em alterações da constante de distribuição. Na prática é muito difícil

levar a cabo alterações no pH quando se usa o modo de imersão directa, uma vez que o revestimento da fibra é danificado a valores de pH muito baixos ou muito altos. No entanto, na extração por *headspace* não há qualquer inconveniente em recorrer à modificação deste parâmetro para conseguir um aumento da sensibilidade da técnica.

Em casos de determinações afectadas pelo pH, as amostras deverão ser tamponizadas para conseguir uma boa reprodutibilidade.

ADIÇÃO DE SAIS

A adição de sais pode produzir uma alteração nos coeficientes de partição, levando muitas vezes a um aumento da quantidade de analito extraída. No entanto, a adição de sais conduz por vezes a uma diminuição na quantidade extraída quando os analitos se encontram na forma dissociada, já que o coeficiente de actividade das espécies iónicas aumenta com o aumento da força iónica da amostra, diminuindo assim o coeficiente de partição. Deste modo, é importante os analitos estarem na sua forma neutra antes da extração.

No caso de analitos neutros e polares, o aumento da força iónica diminui a sua solubilidade, pelo que a quantidade de analito extraída aumenta. Os analitos neutros e apolares não são afectados.

A adição de sais é frequentemente utilizada para aumentar a concentração de compostos polares no *headspace*, melhorando a sua extração [1, 3, 7].

Um dos objectivos da adição de sais à amostra é a compensação da variabilidade da concentração de sal [9].

5. APLICAÇÕES

Apesar de se tratar de uma técnica bastante recente, são muitos os trabalhos publicados na literatura científica nos últimos anos. O maior número encontra-se no campo das análises do meio ambiente, apesar das aplicações clínicas e análise de alimentos estarem em crescimento. Outro campo importante de aplicação é no sector dos aromas e fragrâncias.

Referem-se de seguida alguns exemplos de possíveis usos desta técnica.

ANÁLISES AMBIENTAIS

A SPME tem sido aplicada na extração de compostos orgânicos a partir de diversas matrizes, incluindo amostras de água, ar, solos e sedimentos [10, 11]. A maior parte dos trabalhos refere-se à extração de compostos orgânicos voláteis (VOCs) [1, 12, 13]. No entanto, esta técnica foi também aplicada à determinação de outro tipo de contaminantes, como pesticidas [14-16], fenóis [17], hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), bifenilos policlorados (PCBs) [18, 19], compostos nitroaromáticos e organometálicos [10].

ANÁLISE DE ALIMENTOS

Esta técnica também é utilizada na determinação de contaminantes em alimentos [20, 21], para determinar a composição de alimentos e bebidas [10, 22, 23], e na análise de aromas e sabores [24-26].

APLICAÇÕES FARMACÊUTICAS

No campo das análises farmacêuticas, a SPME é utilizada para determinar voláteis [27], fragrâncias e componentes de cosméticos [28-30].

APLICAÇÕES CLÍNICAS E FORENSES

Esta técnica utiliza-se para a determinação de drogas de abuso, como anfetaminas, ecstasy [11, 31-33], metadona [34, 35], canabinóides [36, 37] e cocaína e metabolitos [38-40] em distintos fluidos biológicos. Além disso, é também possível determinar anestésicos [11, 41], antidepressivos [11, 42], benzodiazepinas [43], barbitúricos [44], fenotiazinas [45], bloqueadores β -adrenérgicos [46], etanol [4, 47], hormonas [48], diluentes [49], pesticidas [11, 50] e estricnina [51].

Outro campo de interesse é na análise de explosivos [3, 52].

OUTRAS APLICAÇÕES

Estão também publicados trabalhos acerca da determinação de óleos essenciais [10] e de constituintes do tabaco [53, 54].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Pawliszyn J. Solid phase microextraction: Theory and practice. New York: Wiley-VCH; 1997.
- [2] Arthur CL, Pawliszyn J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal Chem* 1990; 62: 2145-2148.
- [3] Supelco. SPME/GC for forensic applications: Explosives, fire debris, and drugs of abuse. Bulletin 922. [documento online] 1998 [consultado em 2001 Out 16]. Disponível em: URL: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4546.pdf>.
- [4] Supelco. Solid phase microextraction/capillary GC analysis of drugs, alcohols, and organic solvents in biological fluids. Bulletin 901A. [documento online] 1999 [consultado em 2001 Out 15]. Disponível em: URL: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4533.pdf>
- [5] Supelco. Solid phase microextraction of volatile compounds. Application Note 11. [documento online] 1998 [consultado em 2001 Jul 23]. Disponível em: URL: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4558.pdf>.
- [6] Abdel-Rehim M, Carlsson G, Bielnstein M, Arvidsson T, Blomberg LG. Evaluation of solid-phase microextraction for the study of protein binding in human plasma samples. *J Chromatogr Sci* 2000; 38(10): 458-464.
- [7] Supelco. Solid phase microextraction: Theory and optimization of conditions. Bulletin 923. [documento online] 1998 [consultado em 2001 Out 15]. Disponível em: URL: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4547.pdf>.
- [8] Supelco. Solid phase microextraction of organophosphate insecticides and analysis by capillary GC/MS. Application Note 94. [documento online] 1999 [consultado em 2001 Jul 23]. Disponível em: URL: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4700/4639.pdf>

- [9] Ulrich S. SPME in biomedical analysis. *J Chromatogr A* 2000; 902: 167-194.
- [10] Supelco. SPME Applications guide. 3rd ed. Bulletin 925 B [documento online] 2001 [consultado em 2002 Fev 2]. Disponível em: URL: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/8700/8652.pdf>
- [11] Pawliszyn J. Applications of Solid phase microextraction. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 1999.
- [12] Kuran P, Sojak L. Environmental analysis of volatile organic compounds in water and sediment by GC. *J Chromatogr A* 1996; 733: 119-141.
- [13] Bartelt R., Zilkowski B. Nonequilibrium quantitation of volatiles in air streams by SPME. *Anal Chem* 1999; 71: 92-101.
- [14] Magdic S, Pawliszyn JB. Analysis of organochlorine pesticides using solid-phase microextraction. *J Chromatogr A*. 1996 2; 723(1):111-22
- [15] Boyd-Boland A, Magdic S, Pawliszyn J. Simultaneous determination of 60 pesticides in water using SPME and GC/MS. *Analyst* 1996; 121: 929-938.
- [16] Lambropoulou DA, Sakkas VA, Albanis TA. Validation of an SPME method, using PDMS, PA, PDMS-DVB, and CW-DVB SPME fiber coatings, for analysis of organophosphorus insecticides in natural waters. *Anal Bioanal Chem* 2002; 374(5): 932-941.
- [17] Buchholz K, Pawliszyn J. Determination of phenols by SPME and GC analysis. *J Env Sci Technol* 1993; 27(13): 2844-2848.
- [18] Yang Y, Miller DJ, Hawthorne SB. Solid-phase microextraction of polychlorinated biphenyls. *J Chromatogr A* 1998; 800(2): 257-266.
- [19] Cam D, Gagni N, Punin MO. Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental solid matrices. *J Chromatogr Sci* 2004; 42(6): 329-335.
- [20] Katoak H, Lord H, Pawliszyn J. Application of SPME in food analysis. *J Chromatogr A* 2000; 880 (1+2): 35-62.

- [21] Page B, Lacroix G. Analysis of volatile contaminants in vegetable oils by headspace SPME with carboxen-based fibers. *J Chromatogr A* 2000; 873(1): 79-94.
- [22] Fitzgerald G, James K, MacNamara K, Stack M. Characterization of whiskeys using SPME with GC-MS. *J Chromatogr A* 2000; 896(1-2): 351-359.
- [23] Wasowicz E, Kaminski E, Jelen H, Wazly K. Solid phase microextraction for the analysis of some alcohols and esters in beer: comparison with static headspace method. *J Agric Food Chem* 1998; 46(4): 1496-1473.
- [24] Marsili R, Miller N. Determination of major aroma impact compounds in fermented cucumbers by SPME-GC-MS olfactometry detection. *J Chromatogr Sci* 2000; 38(7): 307-314.
- [25] Chin H, Bemhard R, Rosenberg M. SPME for cheese volatile compound analysis. *J Food Sci* 1996; 61: 1118-1129.
- [26] Peppard T, Xang X. Solid phase microextraction for flavour analysis. *J Agric Food Chem* 1994; 42: 1925-1930.
- [27] Milsson T, Larsen T, Montanarella L, Madsen J. Application of headspace SPME for the analysis of volatile metabolites. *J Microbiol Methods* 1996; 25: 245.
- [28] Liu Z, Wene M. Measurement of gas-liquid partition coefficient and headspace concentration profiles of perfume materials by SPME and capillary. *J Chromatogr Sci* 2000; 38(9): 377-382.
- [29] Lambropoulou DA, Giokas DL, Sakkas VA, Albanis TA, Karayannis MI. Gas chromatographic determination of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone and octyldimethyl-p-aminobenzoic acid sunscreen agents in swimming pool and bathing waters by solid-phase microextraction. *J Chromatogr A* 2002; 967(29): 243-253.
- [30] Rivero RT, Topiwala V. Quantitative determination of formaldehyde in cosmetics using a combined solid-phase microextraction-isotope dilution mass spectrometry method. *J Chromatogr A* 2004; 1029(1-2): 217-22.

- [31] Jurado C, Gimenez MP, Soriano T, Menendez M, Repetto M. Rapid analysis of amphetamine, methamphetamine, MDA, and MDMA in urine using SPME, direct on-fibre derivatization, and analysis by GC-MS. *J Anal Toxicol* 2000; 24(1): 11-16.
- [32] Kongshaug K, Perdensen-Bjergard S, Krongh M, Rasmussen K. SPME/capillary GC for the profiling of confiscated ecstasy and amphetamine. *Chromatographia* 1999; 50(3-4): 247-252.
- [33] Ugland H, Kogh M, Rasmussen K. Automated determination of ecstasy and amphetamines in urine by SPME and capillary GC after polychloroformate derivatization. *J Pharm Biomed Anal* 1999; 19(3-4): 463-475.
- [34] Lucas AC, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernandez P, Strano-Rossi S. Use of SPME for the determination of methadone and EDDP in human hair by GC-MS. *Forensic Sci Int* 2000; 107(1-3): 225-232.
- [35] Bermejo A, Seara R, Lucas AS, Tabernero M, Fernandez P, Marsili R. Use of SPME for the determination of methadone and its main metabolite, EDDP, in plasma by GC-MS. *J Anal Toxicol* 2000; 24: 66-69.
- [36] Hall B, Satterfield-Doeer M, Parikh A, Brodbelt J. Determination of cannabinoids in water and human saliva by SPME and quadrupole ion trap GC-MS. *Anal Chem* 1998; 70(9): 1788-1796.
- [37] Strano-Rossi S, Chiarotti M. Solid-phase microextraction for cannabinoids analysis in hair and its possible application to other drugs. *J Anal Toxicol* 1999; 23(1): 7-10.
- [38] Hall BJ, Parikh AR, Brodbelt JS. Aqueous phase hexylchloroformate derivatization and solid-phase microextraction: determination of benzoylecgonine in urine by gas chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry. *J Forensic Sci* 1999; 44(3): 527-534.
- [39] Toledo FC, Yonamine M, Moreau RLM, Silva OA. Determination of cocaine, benzoylecgonine and cocaethylene in human hair by solid-phase microextraction

and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2003; 798(2): 361-365.

[40] Follador MJ, Yonamine M, Moreau RLM, Silva OA. Detection of cocaine and cocaethylene in sweat by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2004; 811(1): 37-40.

[41] Watanabe T, Namera A, Yaskiki M, Iwasaki Y, Kojima T. Simple analysis of local anaesthetics in human blood using headspace SPME and GC-MS-electron impact ionization selected ion monitoring. *J Chromatogr B* 1998; 709(2): 225-232.

[42] Ulrich S, Martens J. Solid phase microextraction with Capillary GLC and NDPD for the assay of antidepressant drugs in human plasma. *J Chromatogr B* 1997; 696: 217-234.

[43] Luo Y, Pan L, Pawliszyn J. Determination of five benzodiazepines in aqueous solution and biological fluids, using SPME with carbowax/DVB fiber coating. *J Microcolumn Sep* 1998; 10(2): 193-201.

[44] Frison G, Favretto D, Tedeschi L, Ferrara SD. Detection of thiopental and pentobarbital in head and pubic hair in a case of drug-facilitated sexual assaults. *Forensic Sci Int* 2003; 133(1-2):171-174.

[45] Seno H, Kumazawa T, Ishii A, Hattori H, Nishikawa M, Watanabe K, et al. Determination of phenothiazines in human body fluids by SPME and LC-tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2000; 35(9) 1091-1099.

[46] Wu J, Lord H, Pawliszyn J, Kataoka H. Polypyrrole coated capillary in-tube SPME coupled with HPLC electrospray ionization MS for the determination of beta blockers in urine and serum samples. *J Microcolumn Sep* 2000; 12(4): 255-266.

[47] Grote C, Pawliszyn J. Solid phase microextraction for the analysis of human breath. *Anal Chem* 1997; 69: 587-596.

[48] Okeyo P, Snow N. Analysis of estrogens and anabolic steroids by SPME with on-fiber derivatization and GC-MS. *J Microcolumn Sep* 1998; 10(7): 551-556.

- [49] Kim N, Park S. The comparison of toluene determination between headspace SPME and headspace methods in glue sniffer's blood and urine samples. *J Forensic Sci* 2000; 24(3): 702-70.
- [50] Musshoff F, Junker H, Madea B. Simple determination of 22 organophosphorous pesticides in human blood using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J Chromatogr Sci* 2002; 40(1):29-34.
- [51] Barroso M, Gallardo E, Margalho C, Ávila S, Pinho Marques E, Vieira DN, et al. Application of solid phase microextraction to the determination of strychnine in blood. *J Chromatogr B* 2005; 816:29-34.
- [52] Furton K, Almirall J, Bi M, Wang J, Wu L. Application of SPME to the recovery of explosives and ignitable liquid residues from forensic specimens. *J Chromatogr A* 2000; 885(1-2):419-432.
- [53] Watson C, Ashley D. Quantitative analysis of acetates in cigarette tobacco using SPME-GC-MS. *J Chromatogr Sci* 2000, 38(4): 137-144.
- [54] Yang S, Smetena I. Determination of tobacco alkaloids using SPME and GC-NPD. *Chromatographia* 1998; 47(7/8): 443-448.

CAPÍTULO IV

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Aunque las intoxicaciones por pesticidas organofosforados no constituyen un problema sanitario de primera magnitud si se comparan con las que se producen con otras sustancias químicas, existen importantes motivos que justifican la necesidad de disponer de una metodología clara y precisa para su detección y determinación. Por una parte resulta razonable considerar que cualquier Servicio de Toxicología que pretenda ofrecer cobertura analítica en los ámbitos clínico y médico-legal, debe de disponer de este tipo de metodología para hacer frente a posibles casos en los que se requiera evaluar el grado de implicación de este tipo de compuestos en ambas casuísticas.

Por otra parte, las propias características físico-químicas de estos compuestos constituyen un serio problema cuando se trata de determinar sus niveles o identificarlos en los medios biológicos; así son sustancias apolares, de estructuras complejas y variables y metabolismo poco conocido hasta el momento. Los procesos de extracción en medios biológicos requieren pasos relevantes de purificación que hacen aún más complejo su proceso analítico.

Todas estas consideraciones previas nos han llevado a plantear una hipótesis de trabajo encaminada a evaluar distintas posibilidades en relación a la metodología analítica. En primer lugar, nos planteamos abordar un grupo significativo de agentes de uso habitual en el ámbito agrícola y con importantes repercusiones clínicas y médico-legales. De forma simultánea, nos hemos propuesto diseñar procesos de extracción novedosos que no han sido previamente aplicados a este grupo de moléculas, y validar la metodología analítica propuesta de acuerdo con criterios estandarizados internacionalmente aceptados.

Se han elegido cuidadosamente los compuestos a estudiar, tanto en lo que se refiere al tipo de compuestos como al número, seleccionando como representativos del grupo aquellos más frecuentemente implicados en las intoxicaciones en nuestro medio.

El proceso de microextracción en fase sólida, que ha sido descrito en la introducción, ha sido el elegido por las ventajas que, a priori, se le suponían para ser aplicado a este tipo de compuestos. Se ha procedido a la evaluación de determinados parámetros, tales como el tipo de revestimiento, presencia o ausencia de sales, temperaturas y tiempos de adsorción/desorción, etc., que han sido adecuadamente estudiados y optimizados para su implementación en la rutina del análisis toxicológico.

Finalmente se han separado los ocho compuestos por métodos cromatográficos y se han identificado mediante la aplicación de la Espectrometría de Masas, sistema de detección que no deja lugar a dudas en relación a la naturaleza del compuesto.

Por último se han determinado los niveles de pesticidas en los medios biológicos más comúnmente utilizados en los Laboratorios de Toxicología, que son sangre y orina, aplicando los sistemas de validación internacionalmente aceptados, y que constituyen un modelo imprescindible a seguir e implementar en los laboratorios modernos de Toxicología.

Todas y cada una de estas etapas han constituido el eje central en torno al cual se ha desarrollado el trabajo que se presenta, y que ha sido desarrollado en su mayor parte en el Servicio de Toxicología Forense de la Delegación de Coimbra del INML, institución que posee una amplia experiencia en el análisis de este tipo de compuestos por su elevada casuística.

CAPÍTULO V

PARTE EXPERIMENTAL:

DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS
ORGANOFOSFORADOS EN SANGRE Y ORINA

CAPÍTULO V. PARTE EXPERIMENTAL: DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN SANGRE Y ORINA

1. Instrumentación	113
1.1. Sistema cromatográfico	113
1.2. Sistema de detección	113
1.3. Instrumentación general	113
2. Material, disolventes, reactivos y sustancias patrón	114
2.1. Material de laboratorio	114
2.2. Disolventes	114
2.3. Reactivos	114
2.4. Sustancias patrón	115
3. Matrices biológicas	115
4. Disoluciones	116
4.1. Preparación de disoluciones patrón	116
4.2. Otras disoluciones	116
5. Condiciones cromatográficas	117
5.1. Identificación de las sustancias	117
6. Procedimientos de extracción	123
6.1. Aplicación de la SPME a muestras de sangre	123
6.2. Aplicación de la SPME a muestras de orina	123
7. Optimización del procedimiento de extracción	124
Tipos de fibra	124
Volumen de muestra	128
Precipitación de proteínas	129
Tiempo de extracción	131
Tiempo de desorción y temperatura del GC	132

Temperatura	133
Agitación de la muestra	134
Modificación del pH y adición de sales	136
Tratamiento de las fibras tras la extracción	139
8. Vida media de las fibras	139
9. Validación del método analítico	140
Selectividad	140
Curva de calibración	145
Precisión y exactitud	150
Ensayos intradía	151
Ensayos interdía	152
Límites de detección y cuantificación	154
Recuperación	156
Efecto de la dilución de la muestra	158
Estabilidad	159
Estabilidad de las soluciones estándar	160
Estabilidad de los analitos en muestras procesadas	160
Estabilidad de los analitos tras períodos cortos a la	161
temperatura de trabajo en el laboratorio	
Estabilidad a ciclos de congelación-descongelación	161
10. Aplicaçãõ a casos clínicos e forenses	162
Referencias Bibliográficas	168

1. INSTRUMENTACIÓN

1.1. SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Se ha utilizado un cromatógrafo de gases Hewlett Packard HP 6890 series GC system equipado con un inyector automático HP 7683 y una columna capilar de sílice fundida Ultra 2 (5% de fenilmetilsiloxano) de dimensiones 12m x 0,25 μ m x 0,25mm d.i.

1.2. SISTEMA DE DETECCIÓN

El sistema de detección empleado fue un detector de espectrometría de masas HP 5973, operando en modo de impacto electrónico.

1.3. INSTRUMENTACIÓN GENERAL

- Dispositivo manual de microextracción en fase sólida modelo 5-7330 y fibras con cubierta de polidimetilsiloxano (100 μ m de espesor) y carbowaxTM/divinilbenzeno (65 μ m de espesor), Supelco.
- Balanza analítica digital 92SM-202, Precisa.
- Vortéx MR 2002, Heidolph.
- Medidor de pH HI 8424, HANNA instruments.
- Bloque térmico Thermobloc, Falc.
- Baño de ultrasonidos Sonorex super RK-510H, Bandelin.
- Sistema de purificación de agua Milli-Q, Millipore.
- Placa de agitación magnética
- Pipetas automáticas, Gilson y Eppendorf.
- Cámara frigorífica.

- Cámara de congelación.
- Campana de extracción.

2. MATERIAL, DISOLVENTES, REACTIVOS Y SUSTANCIAS PATRÓN

2.1. MATERIAL DE LABORATORIO

- Tubos de vidrio de 1 mL y respectivas cápsulas, Waters®.
- Matraces aforados de 1, 2, 5, 10 y 100 mL.
- Vasos de precipitados.
- Botes de cristal boricado ámbar de 7 y 12 mL para almacenamiento de disoluciones patrón.
- Agitador magnético de 5 mm de longitud.

2.2. DISOLVENTES

- Agua Milli-Q.
- Metanol LiChrosolv®, Merck.
- Acetonitrilo LiChrosolv® Gradient grade, Merck.
- Ácido perclórico 70-72% para análisis, Merck.

2.3. REACTIVOS

- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4), Merck.
- Fosfato disódico di-hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Merck.
- Cloruro sódico (NaCl), Merck.

2.4. SUSTANCIAS PATRÓN

- Azinfos metil Pestanal®, Riedel-de Haën.
- Clorpirifos Pestanal®, Riedel-de Haën.
- Clorfenvinfos (mezcla racémica Z + E) Pestanal®, Riedel-de Haën.
- Diazinón, Ciba-Geigy.
- Dimetoato Pestanal®, Riedel-de Haën.
- Etil paratión (paratión) Pestanal®, Riedel-de Haën.
- Paraoxon, Sigma Chemica Co.
- Quinalfos Pestanal®, Riedel-de Haën.
- Etión, Polyscience Corp.

Esta última sustancia fue escogida como patrón interno, por ser un organofosforado no comercializado en Portugal y del que no existen intoxicaciones documentadas en los últimos 8 años. Además, posee buen comportamiento cromatográfico y no interfiere con los otros pesticidas ni con las matrices empleadas.

3. MATRICES BIOLÓGICAS

La sangre y la orina fueron las matrices biológicas elegidas para el desarrollo y validación de la metodología analítica. En el caso de las muestras de sangre blanco, se utilizaron bolsas procedentes del *Instituto Português do Sangue*, preservadas con una solución citrato fosfato dextrosa (1:7) y almacenadas a 4 °C. Las muestras de orina blanco fueron obtenidas de sujetos voluntarios sanos.

4. DISOLUCIONES

4.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES PATRÓN

Las disoluciones patrón de los pesticidas de estudio se prepararon por dilución de la sustancia pura en metanol de la siguiente manera:

Para matraces aforados de 5 mL fueron pesados 5 mg de cada uno de los pesticidas, añadiendo a continuación metanol hasta obtener un volumen final de 5 mL. Se obtuvieron así las disoluciones madre de 1 mg/mL que fueron almacenadas a -20 °C y protegidas de la luz.

A partir de estas disoluciones fueron elaboradas diluciones sucesivas con metanol para obtener las soluciones de trabajo a 100, 10, 1 y 0,1 µg/mL.

Todas estas diluciones fueron protegidas da luz y almacenadas a 4° C.

4.2. OTRAS DISOLUCIONES

TAMPÓN FOSFATO 1/15 M

Se han preparado dos disoluciones [1]:

Disolución A - Se pesaron 0,9073 g de KH_2PO_4 enrasando con agua Milli-Q hasta un volumen de 100 mL en matraz aforado.

Disolución B - Se pesaron 1,187 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ enrasando con agua Milli-Q hasta un volumen de 100 mL en matraz aforado.

Esta segunda disolución fue utilizada para ajustar el pH de la primera a diferentes valores (5-8).

CLORURO SÓDICO A 15% (M/V)

Se pesaron 15 g de NaCl, disueltos con agua Milli-Q, enrasando hasta 100 mL en un matraz aforado.

5. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

El programa de temperaturas del cromatógrafo se inició a 100 °C durante dos minutos, seguido de una primera rampa de temperaturas de 10 °C/minuto hasta 200 °C y una segunda rampa de 24 °C/minuto hasta alcanzar 270 °C manteniendo esta temperatura durante dos minutos, siendo el tiempo total de 17,92 minutos.

La temperatura del inyector fue de 240 °C y se trabajó en modo *splitless*. Como gas portador fue utilizado el helio, a un flujo constante de 1 mL/minuto.

En cuanto al detector de masas (MS), las temperaturas de la línea de transferencia, fuente de iones y cuadrupolo fueron respectivamente de 280, 230 y 150 °C. La corriente del filamento fue de 300 μ A con una energía de 70 eV.

El análisis se realizó tanto en modalidad SIM (Selective Ion Monitoring) como SCAN.

5.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS

La identificación de las sustancias se realizó en base al tiempo de retención y respectivo espectro de masas. Estos parámetros fueron obtenidos tras una inyección de soluciones metanólicas de cada uno de los pesticidas de estudio en el cromatógrafo (Figuras 9 a 17), en modo SCAN (rango 50-550 *m/z*).

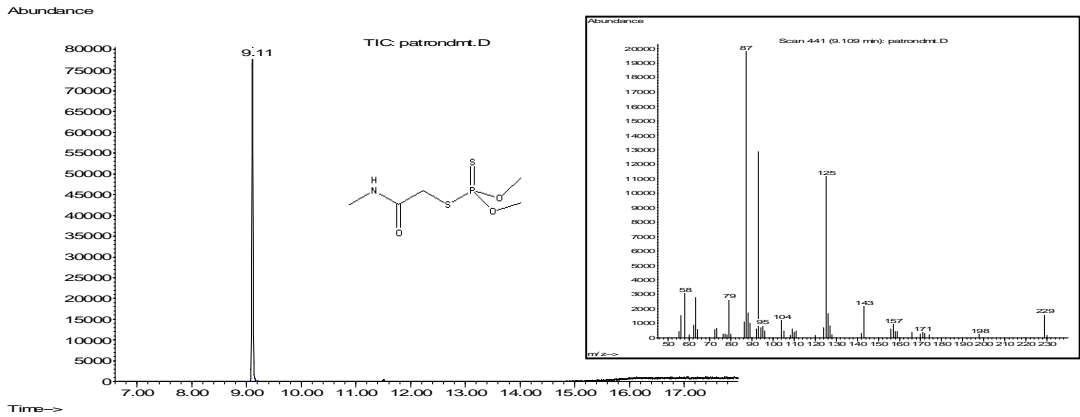


Figura 9: Cromatograma, estructura y espectro de masas de la molécula de **dimetoato**.

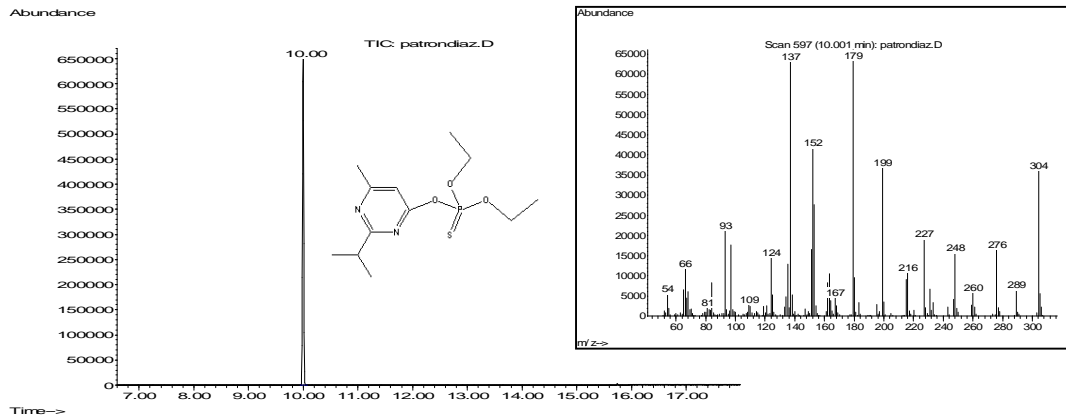


Figura 10: Cromatograma, estructura y espectro de masas de la molécula de **diazinón**.

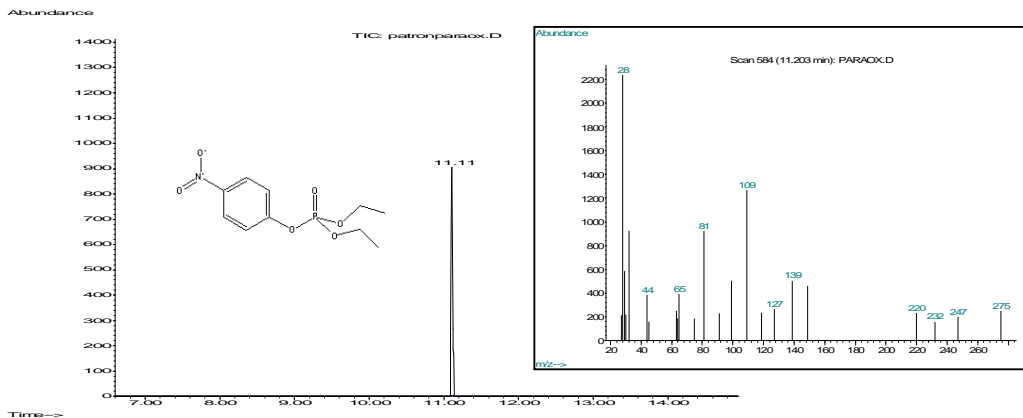


Figura 11: Cromatograma, estructura y espectro de masas de la molécula de **paraoxon**.

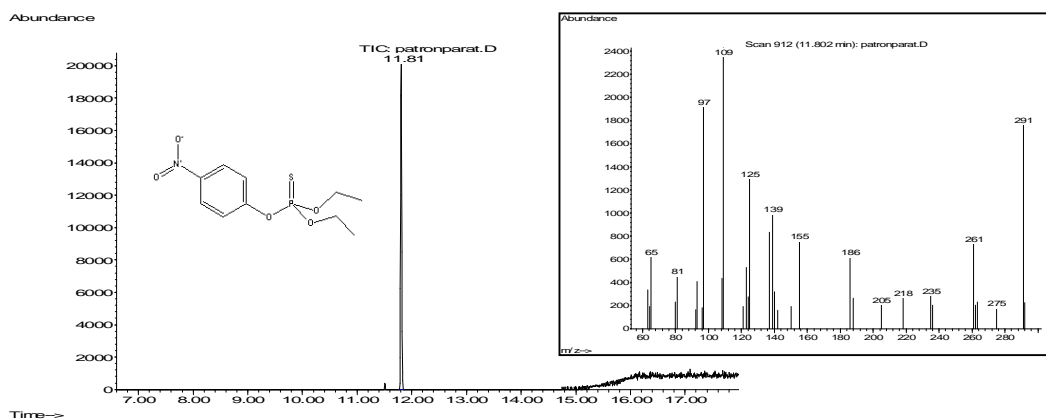


Figura 12: Cromatograma, estructura y espectro de masas de la molécula de **paratión**.

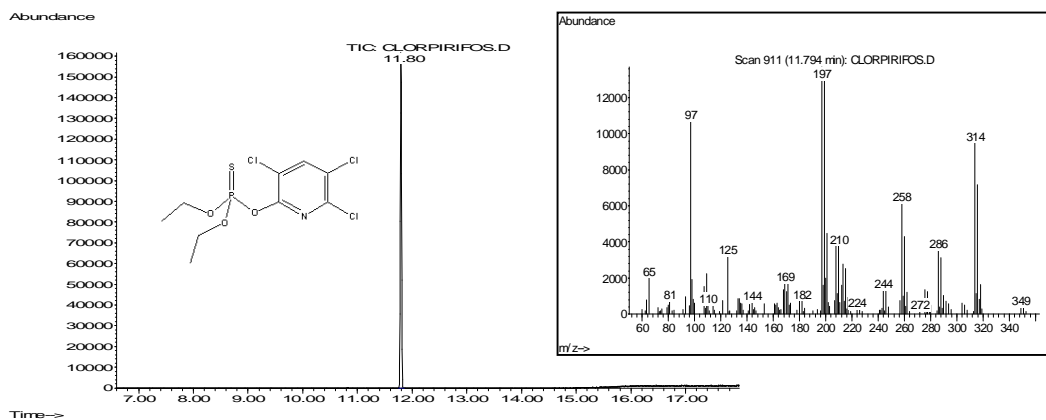


Figura 13: Cromatograma, estructura y espectro de masas de la molécula de **clorpirifos**.

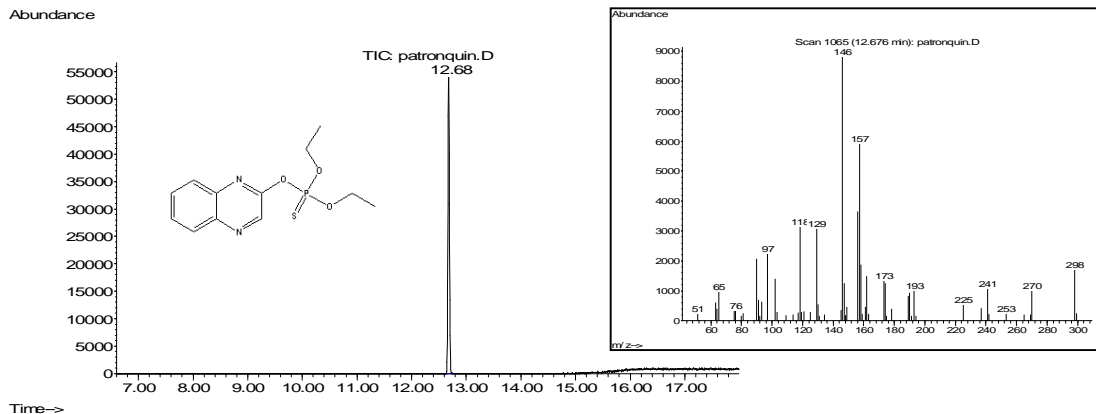


Figura 14: Cromatograma, estructura y espectro de masas de la molécula de **quinalfos**.

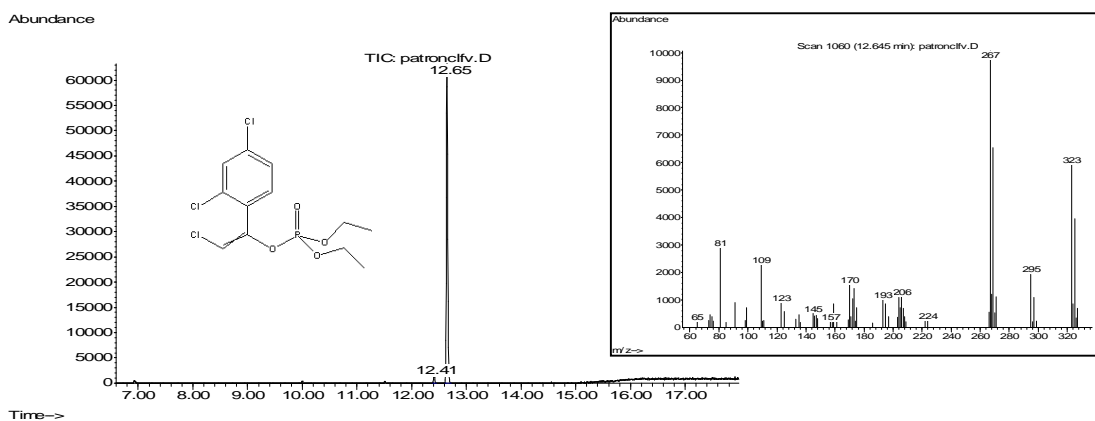


Figura 15: Cromatograma, estructura y espectro de masas de la molécula de clorfenvinfos.

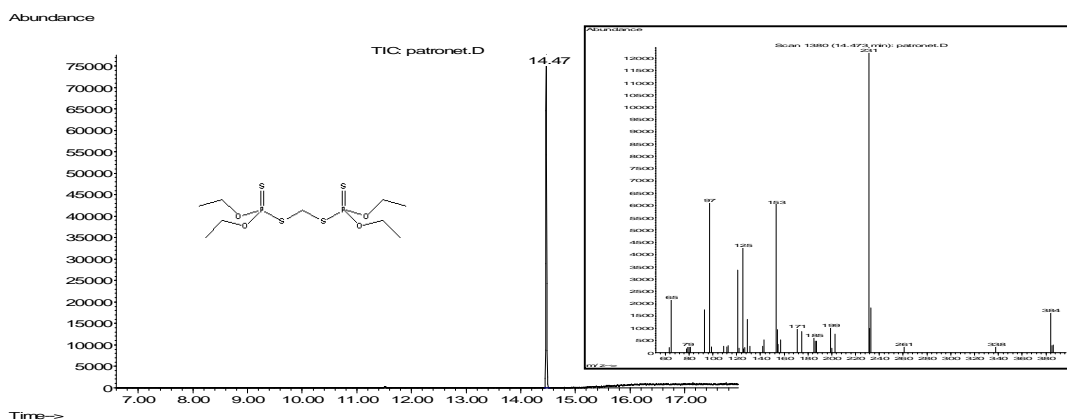


Figura 16: Cromatograma, estructura y espectro de masas de la molécula de eti6n.

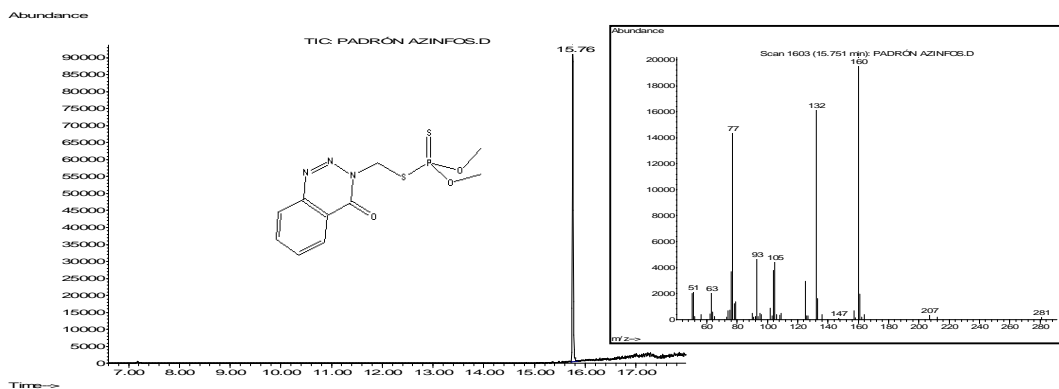


Figura 17: Cromatograma, estructura y espectro de masas de la molécula de azinfos metil.

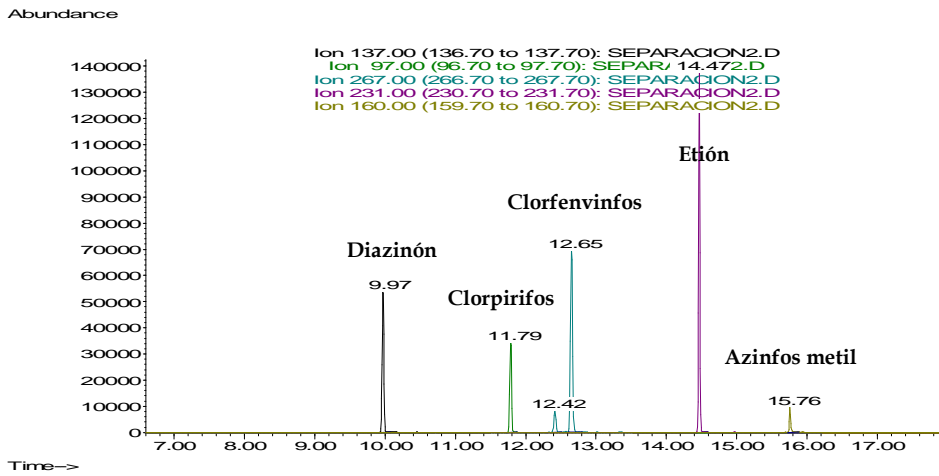
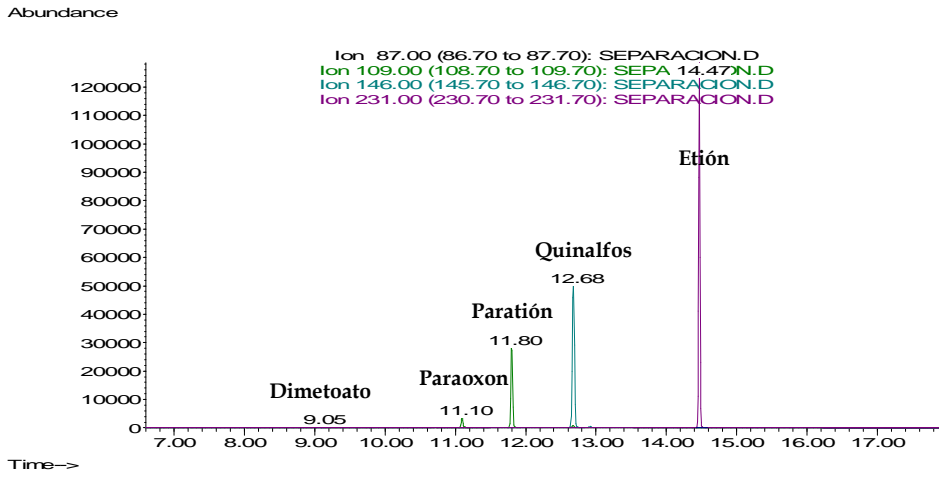
El análisis cuantitativo se realizó en modalidad SIM y los iones escogidos junto con los tiempos de retención de cada pesticida se encuentran descritos en la Tabla 4.

Tabla 4. Descripción de los iones seleccionados y tiempos de retención para cada uno de los pesticidas de estudio.

SUSTANCIA	IONES SELECCIONADOS (<i>m/z</i>)	TIEMPOS DE RETENCIÓN (MINUTOS)
Dimetoato	87 ; 93; 125	9,05
Diazinón	137 ; 179; 199	9,97
Paraoxon	109 ; 149; 275	11,10
Clorpirifos	97 ; 125; 197	11,79
Paratión	109 ; 139; 186	11,80
Clorfenvinfos	267 ; 81; 109	12,65
Quinalfos	146 ; 118; 157	12,68
Etión	231 ; 125; 153	14,47
Azinfos metil	160 ; 132; 105	15,76

* Los iones cuantificadores aparecen en negrita.

Con este programa de temperaturas de horno, se consiguió una buena separación cromatográfica (Figuras 18 y 19), a pesar de que no se logró separar el clorpirifos del paratión ni el clorfenvinfos del quinalfos. Sin embargo, estos pesticidas no tienen iones comunes entre ellos, por lo que este hecho no ha constituido un problema.



Figuras 18 y 19: Cromatogramas en modo SIM de los iones utilizados para la cuantificación de cada uno de los ocho pesticidas (1µg) incluyendo el patrón interno.

6. PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN

6.1. APLICACIÓN DE LA SPME A MUESTRAS DE SANGRE

En un tubo de vidrio de 1 mL se pipetearon 100 μL de sangre a los que se añadieron 10 μL de patrón interno (eti6n) de concentraci6n 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y agua Milli-Q hasta completar un volumen final de 1mL. Despu6s de agitar vigorosamente la muestra en vortex durante 30 segundos, el dispositivo de SPME fue introducido en el tubo, poniendo la fibra en contacto con la muestra (SPME en modalidad de inmersi6n directa). Tras 60 minutos de extracci6n a 60 $^{\circ}\text{C}$, la fibra fue recogida y lavada durante 2 segundos con agua desionizada para su posterior desorci6n en el inyector del cromat6grafo de gases a 240 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 minuto.

6.2. APLICACI6N DE LA SPME A MUESTRAS DE ORINA

La preparaci6n de la muestra de orina fue similar a la de sangre. En un tubo de vidrio de 1 mL se pipetearon 100 μL de sangre a los que se a6adieron 10 μL de patr6n interno (eti6n) de concentraci6n 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se adici6n6 agua Milli-Q hasta completar un volumen final de 1mL. Despu6s de agitar vigorosamente la muestra en vortex durante 30 segundos, el dispositivo de SPME fue introducido en el tubo, poniendo la fibra en contacto con la muestra. Tras 60 minutos de extracci6n a 90 $^{\circ}\text{C}$, la fibra fue recogida y llevada al inyector del cromat6grafo de gases a 240 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 minuto para su desorci6n (Figura 20).

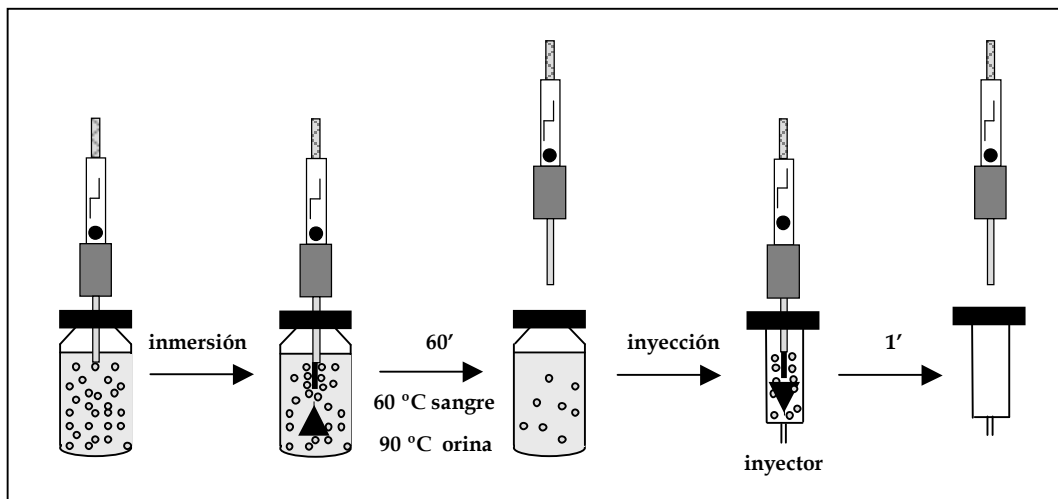


Figura 20: Esquema del procedimiento de extracción

7. OPTIMIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

Tal y como comentamos en el capítulo anterior, la microextracción en fase sólida es una técnica de extracción no exhaustiva, es decir, se trata de un proceso de equilibrio entre la matriz y la cubierta de la fibra [2]. Así pues, es necesario optimizar varios parámetros para que la recuperación del método (normalmente inferior a la obtenida por LLE ó SPE) sea la máxima posible. La optimización de los distintos parámetros estudiados, que se describen a continuación, fue llevada a cabo, por triplicado, para cada pesticida (por separado) en cada una de las matrices analizadas.

TIPOS DE FIBRA

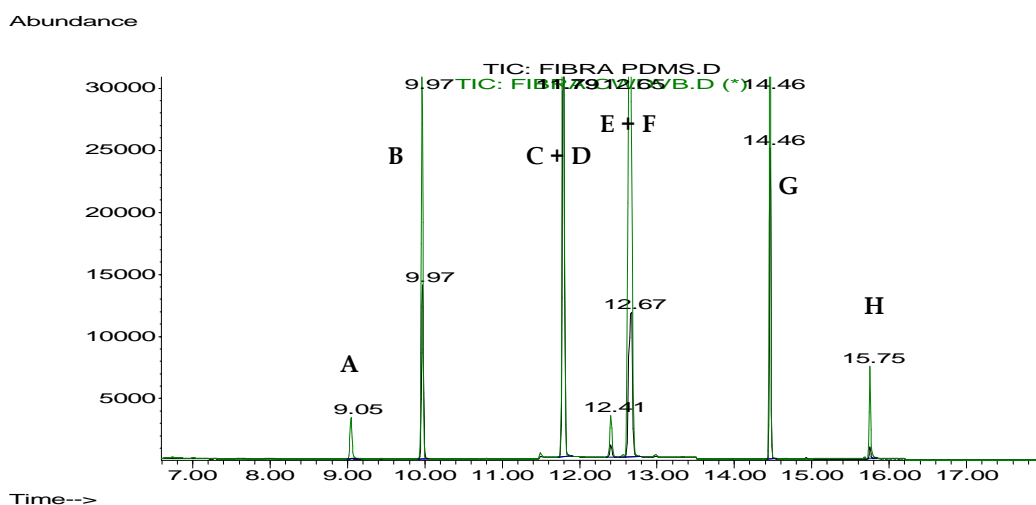
Para la realización de este trabajo, se evaluaron dos tipos de fibra con diferente revestimiento: una más general, de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μm de

espesor y otra específica para analitos volátiles, de carbowax™/divinilbenzeno (CW/DVB) de 65 µm de espesor.

Antes de proceder a la extracción, ambas fibras fueron acondicionadas en el inyector del cromatógrafo durante 30 minutos, según las recomendaciones del fabricante. Así la fibra de PDMS fue acondicionada a 250 °C y la de CW/DVB a 220 °C.

Posteriormente muestras de 100 µL de sangre y orina, previamente adicionadas de 1 µg de cada uno de los pesticidas de estudio, fueron extraídas con ambas fibras durante 40 minutos. Transcurrido este tiempo, se procedió a la desorción de las mismas durante 3 minutos.

Finalmente las áreas obtenidas con cada una de las fibras fueron comparadas y, como se puede observar en las Figuras 21 y 22, con la fibra de CW/DVB fue posible extraer una cantidad mayor de analito, por lo que fue ésta la fibra de elección.



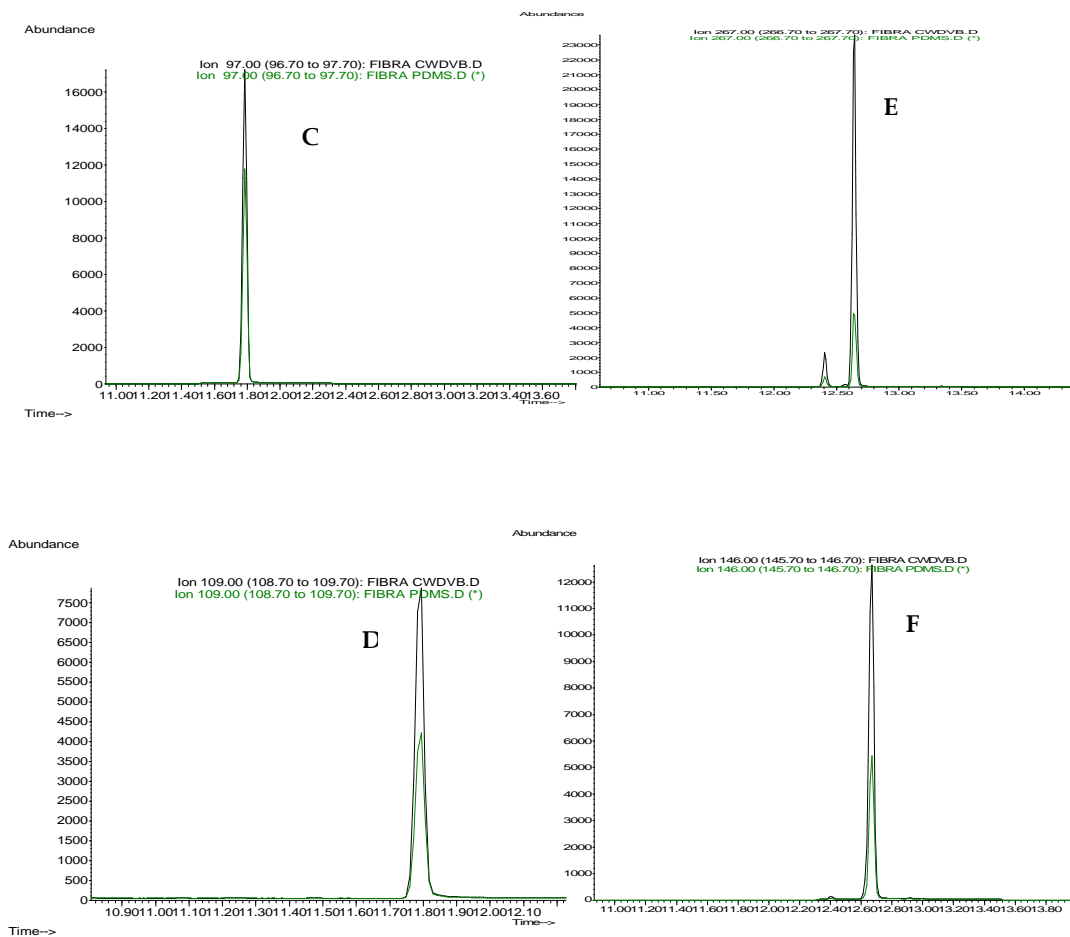


Figura 21: Superposición de los cromatogramas obtenidos con cada una de las fibras en una muestra de orina que contiene 1 µg/mL de cada uno de los pesticidas: **A** (dimetoato); **B** (diazinón); **C** (clorpirifos); **D** (paratión); **E** (clorfenvinfos); **F** (quinalfos); **G** (etion) y **H** (azinfos metil). En el caso del paratión/clorpirifos y clorfenvinfos/quinalfos, como tienen los mismos Tr, se muestra la superposición de los iones cuantificadores.

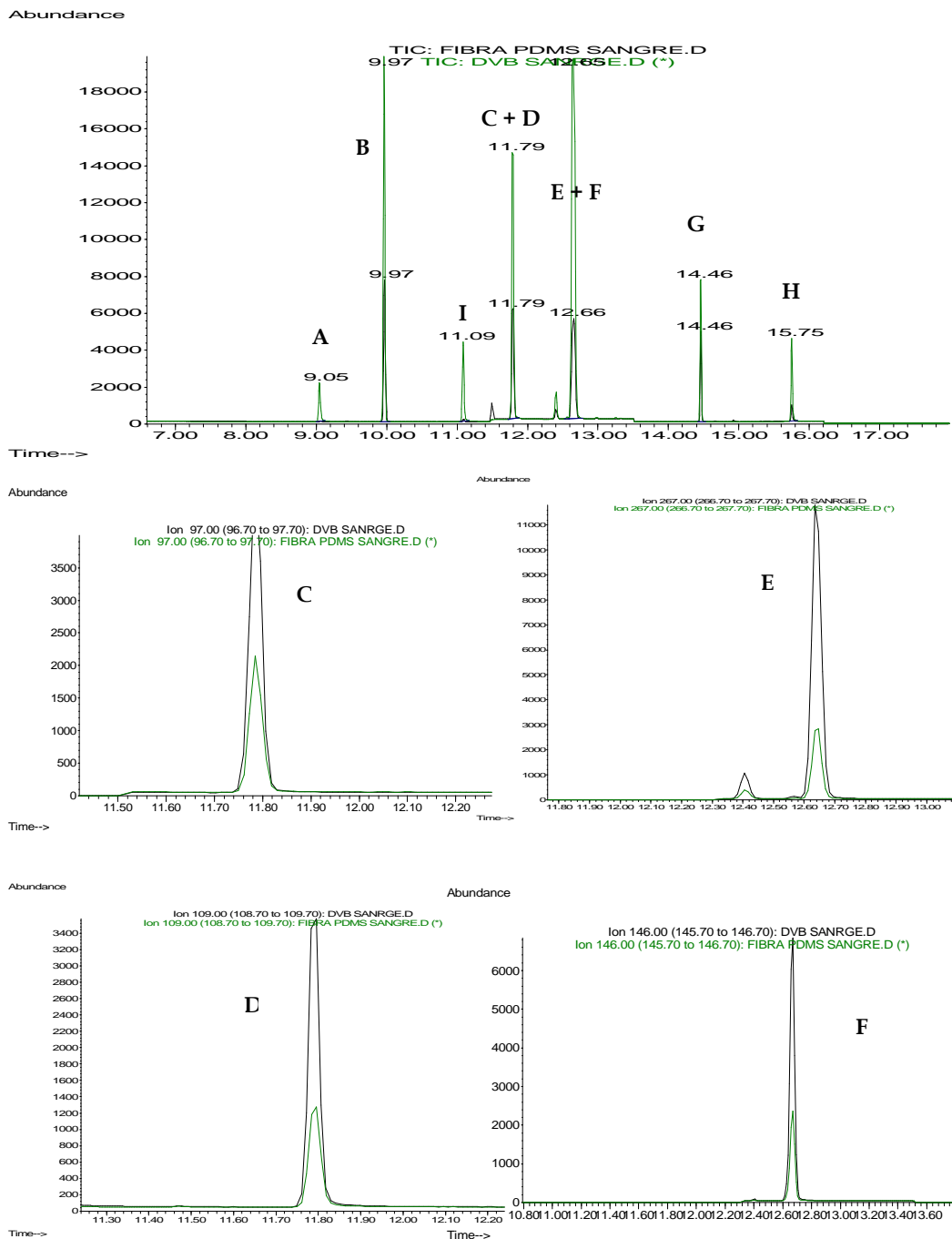


Figura 22: Superposición de los cromatogramas obtenidos con cada una de las fibras en una muestra de sangre que contiene 1 µg/mL de cada uno de los pesticidas: **A** (dimetoato); **B** (diazinón); **C** (clorpirifos); **D** (paratión); **E** (clorfenvinfos); **F** (quinalfos); **G** (etíon), **H** (azinfos metil) e **I** (paraoxon). En el caso del paratión/clorpirifos y clorfenvinfos/quinalfos, como tienen los mismos Tr, se muestra la superposición de los iones cuantificadores.

VOLUMEN DE MUESTRA

La sangre es una matriz compleja compuesta por sustancias, como ácidos grasos o proteínas, capaces de disminuir la vida media de las fibras o de competir con el analito por las mismas, pudiendo disminuir la cantidad extraída por éstas. Por ello, fue necesario optimizar el volumen de muestra empleado de la siguiente manera: 1 μg de cada pesticida fue adicionado a diferentes volúmenes de sangre (1000, 500, 100 μL), enrasando posteriormente hasta 1 mL con agua Milli-Q. Tras 40 minutos de extracción la fibra fue desorbida durante 3 minutos en el inyector del GC. Esta operación fue realizada por triplicado ($n=3$) para cada uno de los volúmenes ensayados.

Con los volúmenes de 1000 y 500 μL de sangre no se obtuvo señal cromatográfica de los pesticidas, por lo que el volumen de muestra utilizado para continuar el trabajo fue de 100 μL , ya que éste sí que permitió obtener una buena señal.

En el caso de la muestra de orina, se procedió de igual manera que con sangre, se realizaron diferentes extracciones ($n=3$) de cada pesticida a 1 μg en distintos volúmenes de orina (1000, 500 y 100 μL). Como se puede observar en la Figura 23, apenas hubo diferencia respecto a la cantidad extraída de pesticida frente al volumen de muestra empleado, por lo que también se optó por escoger el volumen de 100 μL como volumen de trabajo, ya que al estar la fibra en menor contacto con los componentes de la matriz, permitirá aumentar su vida media.

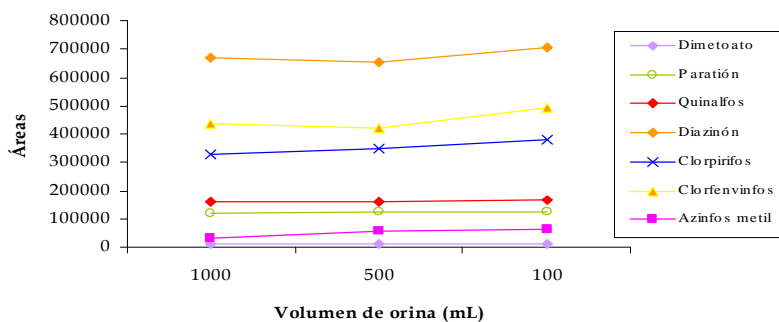


Figura 23: Influencia del volumen de orina sobre la cantidad extraída de pesticida (áreas).

PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

Paralelamente al estudio del volumen de sangre, se intentó hacer una precipitación previa de proteínas antes de la extracción. Para ello se adicionó un 1 mL de ácido perclórico 1M a 1 mL de sangre que contenía 1 µg de cada pesticida, se agitó la muestra en vórtex durante 3 minutos, y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se procedió a la neutralización con tampón fosfato 1/15 M hasta un pH 7.

Finalmente la fibra fue sumergida en la muestra durante 40 minutos y desorbida 3 minutos en el inyector de cromatógrafo. Tal y como se puede observar en las Figuras 24 y 25, que muestran la extracción del dimetoato con y sin precipitación de proteínas, podemos concluir que esta precipitación además de hacer más complicada y tediosa la extracción, hace que se pierda el propio dimetoato.

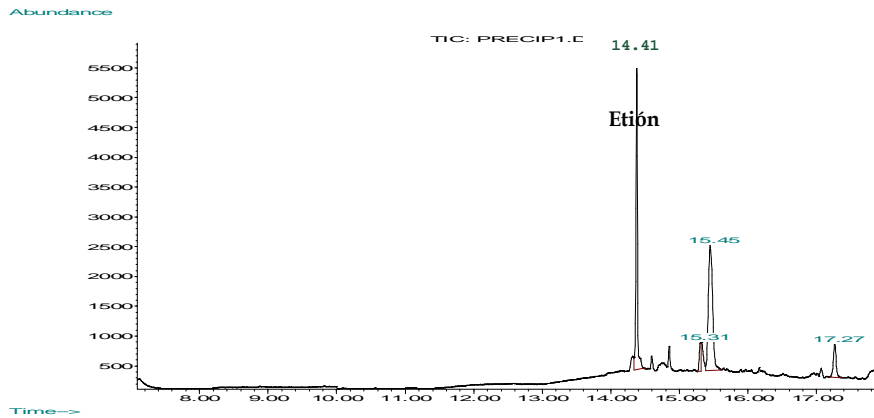


Figura 24: Extracción de 1 μg de **dimetoato** y **eti3n** tras precipitación de proteínas con ácido percl3rico.

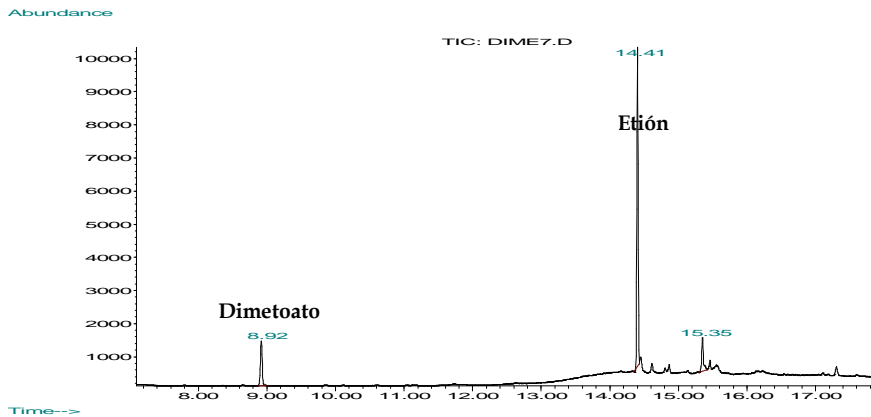


Figura 25: Extracción de 1 μg de **dimetoato** y **eti3n** sin precipitación de proteínas.

Además del ácido percl3rico, se emplearon otros métodos de precipitación de proteínas: con ultrasonidos (manteniendo la muestra durante 15 minutos) y con acetonitrilo (adición de 500 μL a 1 mL de sangre), sin obtener buenos resultados en ningún caso.

TIEMPO DE EXTRACCIÓN

Éste es uno de los parámetros clave en la SPME, ya que como hemos dicho anteriormente la microextracción es una técnica basada en el equilibrio. Para determinar el efecto del tiempo de extracción respecto a la cantidad extraída (representada como área de pico), se expuso la fibra a 10 tiempos diferentes (1, 5, 10, 15, 25, 35, 40, 60, 90, 180 minutos) en muestras de sangre y orina (100 μ L) que contenían 1 μ g de cada pesticida. Al final de cada extracción la fibra fue desorbida en el inyector del GC por un periodo de 3 minutos (Figuras 26 y 27).

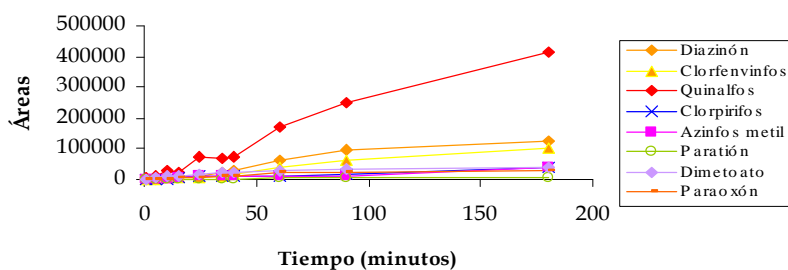


Figura 26: Cantidad extraída de cada analito en sangre frente al tiempo de extracción.

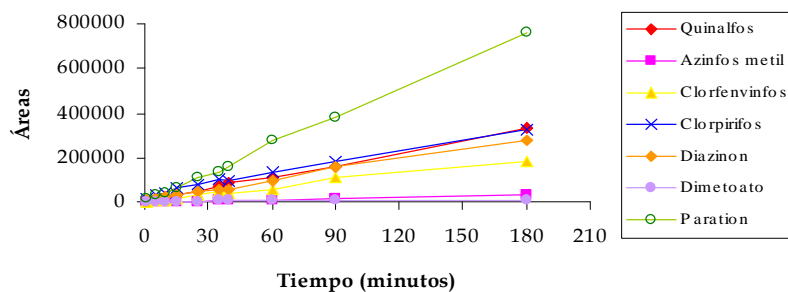


Figura 27: Cantidad extraída de cada analito en orina frente al tiempo de extracción.

Como se puede observar, en ambos casos después de 3h de extracción no se llegó a alcanzar el tiempo de equilibrio, a excepción del dimetoato que a partir de 40 minutos la cantidad extraída apenas variaba con el aumento del tiempo. Por tanto, se optó por una solución de compromiso, que sin prolongar demasiado el tiempo de extracción permitiese obtener una buena sensibilidad cromatográfica, y este tiempo fue de 60 minutos.

TIEMPO DE DESORCIÓN Y TEMPERATURA DEL GC

El objetivo de la optimización de este parámetro es la desorción completa del analito adsorbido en la fibra en el menor tiempo posible, con el fin de aumentar la sensibilidad del método y evitar simultáneamente los efectos *carry-over* [3].

Para determinar este tiempo, después de 60 minutos de inmersión de la fibra en una muestra de sangre y orina que contenía 1 µg de cada pesticida de estudio, se procedió a su desorción en el inyector del cromatógrafo (220 y 240 °C) durante diferentes tiempos, concretamente 1, 2, 3, 4 y 6 minutos. Las áreas de cada pesticida fueron comparadas para cada tiempo y cada temperatura, obteniendo los mejores resultados con 1 minuto de desorción a 240 °C.

Para comprobar la inexistencia de efectos de *carry-over*, la fibra fue sumergida de nuevo durante 60 minutos en sangre y orina, pero esta vez conteniendo 100 µg de cada pesticida. Transcurrido este tiempo fue sometida a un primer proceso de desorción durante 1 minuto a 240 °C. Finalizado el cromatograma, la fibra fue de nuevo desorbida durante 1 minuto a la misma temperatura, y se comprobó que no existían restos de pesticidas de la extracción anterior en la fibra.

TEMPERATURA

Como hemos dicho en el capítulo de Microextracción en fase sólida, un aumento en la temperatura de extracción ocasiona un aumento en la velocidad de extracción, originando tiempos de extracción más cortos ya que se alcanza antes el equilibrio.

Pese a que en nuestro caso, no se alcanzó un tiempo de equilibrio y que el parámetro de la temperatura es más importante en la SPME por *headspace* que por inmersión directa, decidimos experimentar diferentes temperaturas tanto en sangre como en orina.

Así para las muestras de sangre (que contenían 1 µg de cada pesticida), se ensayaron temperaturas de 25, 40, 50 y 60 °C con la ayuda de un baño térmico. Temperaturas superiores a 60 °C provocaban la coagulación de la muestra.

Con la muestra de orina, se procedió de la misma manera, pero alcanzando temperaturas superiores en este caso, concretamente las temperaturas ensayadas fueron 25, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 °C.

El procedimiento de extracción fue similar a los apartados anteriores, y después de 60 minutos de extracción, la fibra fue desorbida a 240 °C durante 1 minuto.

Como se puede comprobar en las siguientes Figuras, los mejores resultados se consiguieron a 60 °C en sangre y a 90 °C en orina. En ambos casos, comprobamos que la cantidad extraída de cada pesticida era superior a la obtenida a 25°C durante 180 minutos de extracción.

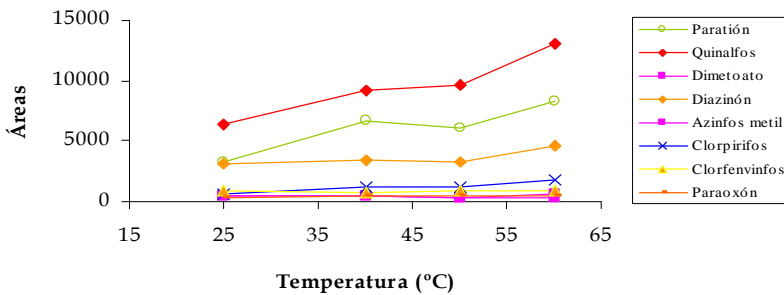


Figura 28: Influencia de la temperatura sobre a la cantidad de analito extraída en sangre.

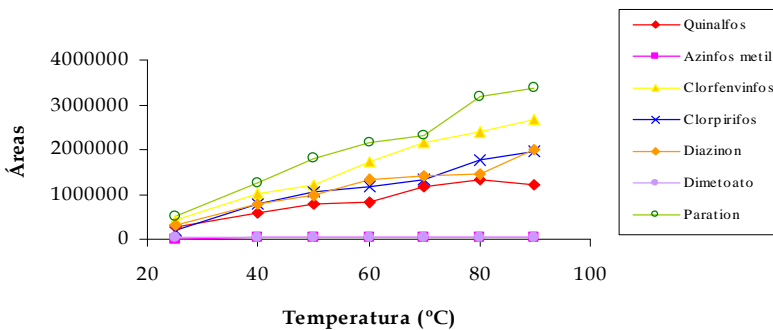


Figura 29: Influencia de la temperatura sobre a la cantidad de analito extraída en orina.

Con las temperaturas ya optimizadas, se repitió el estudio del tiempo de inmersión para comprobar si se alcanzaba un tiempo de equilibrio de extracción, observando nuevamente que en el caso de los pesticidas organofosforados y con nuestras condiciones de trabajo no se alcanzaba el equilibrio.

AGITACIÓN DE LA MUESTRA

La agitación de la muestra es un parámetro importante, ya que permite reducir el tiempo de equilibrio y mejorar la precisión y exactitud de los resultados [4].

Para evaluar la influencia de la agitación de la muestra frente a la eficiencia de la extracción, se compararon muestras de sangre y orina que contenían cantidades de 2,5 μg de cada pesticida con y sin agitación durante los 60 minutos que dura el proceso de extracción.

Se comprobó que la agitación no originaba mejoras significativas en el rendimiento de extracción, por lo que se optó por no agitar la muestra, ya que además de hacer más complicado y laborioso el proceso de extracción, el sistema de agitación no se encontraba acoplado con el baño térmico.

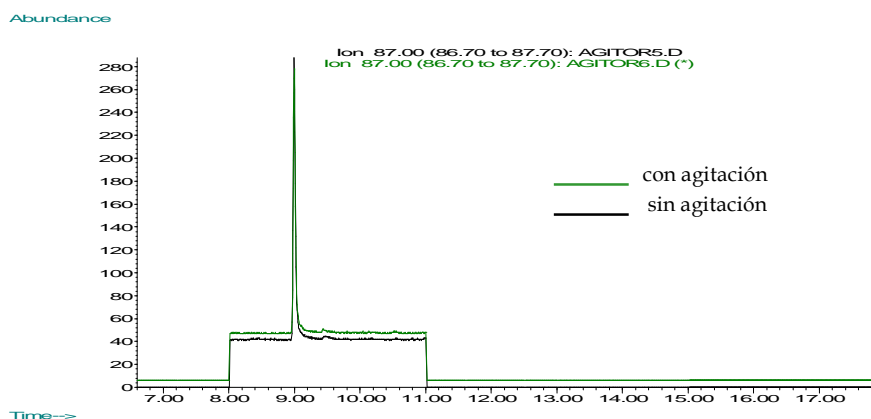


Figura 30: Superposición de los cromatogramas obtenidos con y sin agitación durante la extracción de 2,5 μg de **dimetoato** en sangre.

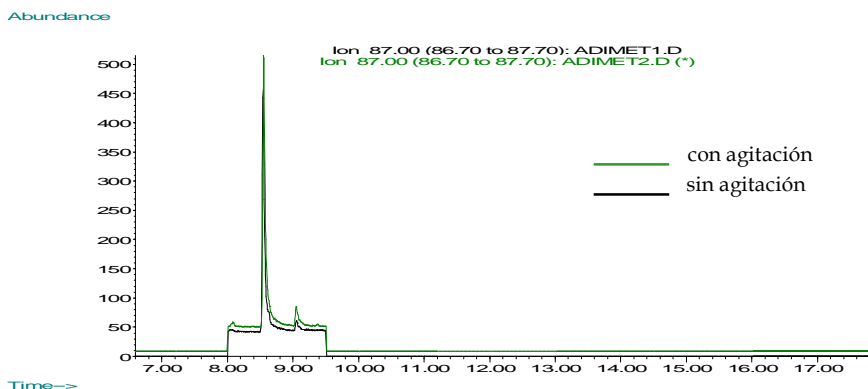


Figura 31: Superposición de los cromatogramas obtenidos con y sin agitación durante la extracción de 2,5 μg de **dimetoato** en orina.

En los cromatogramas superiores podemos observar que la agitación de la muestra en el caso de la extracción del dimetoato tanto en orina como en sangre, no conduce a mejoras significativas en la cantidad de analito extraída.

Se muestra únicamente el dimetoato, al ser el que posee menor señal cromatográfica en ambas matrices.

MODIFICACIÓN DE PH Y ADICIÓN DE SALES

La modificación de pH y la adición de sales son dos parámetros que sirven para mejorar la extracción de analitos orgánicos a partir de matrices acuosas [3]. El pH de la muestra es crucial en la SPME, sobre todo en el modo *headspace* ya que permite minimizar la solubilidad del analito en la muestra. Además, trabajando a pH básico, las sustancias básicas son mejor extraídas, y sucede lo contrario con las ácidas [5].

En nuestro caso, el efecto del pH sobre la extracción se observó a través de diluciones de muestras de sangre y orina (que contenían 1 µg de cada pesticida) con tampón fosfato 1/15 M a diferentes pH (5-8).

Como se observa en la Figura 32, la modificación de pH apenas afectó a la extracción de los pesticidas en sangre.

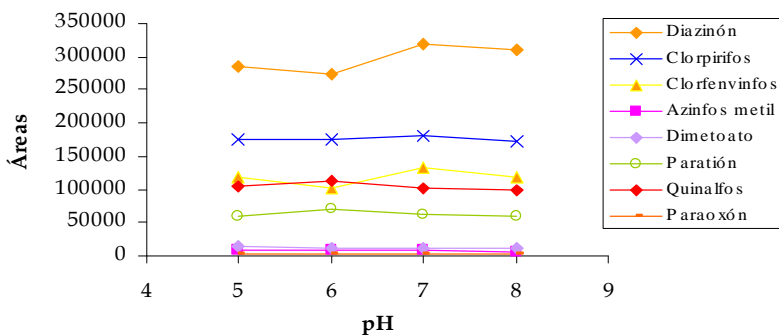


Figura 32: Efecto del pH sobre la cantidad de pesticida extraída (áreas) en sangre.

En el caso de la muestra de orina, la modificación de pH originó resultados más dispares (Figura 33).

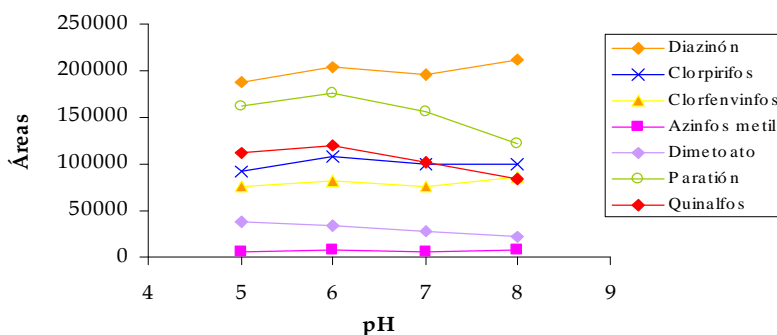


Figura 33: Efecto del pH sobre la cantidad de pesticida extraída (áreas) en orina.

Sin embargo, si se comparan estos resultados con las diluciones hechas con agua Milli-Q, con estas últimas se obtuvo un mayor rendimiento de extracción, posiblemente debido a un aumento de la concentración de sales, procedentes del tampón fosfato [6].

Hay que recordar que este tipo de fibra, carbowaxTM/dvb, no debe ser utilizada a valores de pH superiores a 9 e inferiores a 2, y que en ningún caso, deben emplearse ácidos minerales o hidróxidos de sales para ajustar el pH de la muestra [4].

La adición de sales a la muestra puede aumentar o disminuir la cantidad de analito extraída, dependiendo del analito y de la concentración de sal. Generalmente este efecto aumenta con el aumento de la polaridad del compuesto. La saturación con sal puede ser empleada no solo para disminuir los LODs, sino también para normalizar la variación de las concentraciones de sal en las matrices [2].

El efecto de la fuerza iónica sobre la eficacia de la extracción fue evaluada observando la cantidad de analito extraída frente a aumentos en la cantidad de cloruro sódico en la solución de agua utilizada para diluir la muestra. Se

ensayaron diferentes cantidades de NaCl (%): 0; 0,375; 0,75; 1,5 y 3, 5 y 10. En ambas muestras (sangre y orina), se observó una disminución en la cantidad extraída con el aumento de la concentración de sales en la muestra (Figuras 34 y 35), lo que corrobora los resultados obtenidos con el pH.

A la vista de los resultados obtenidos para la continuación de este trabajo, no se modificó el pH ni se adicionó sales durante el procedimiento de extracción.

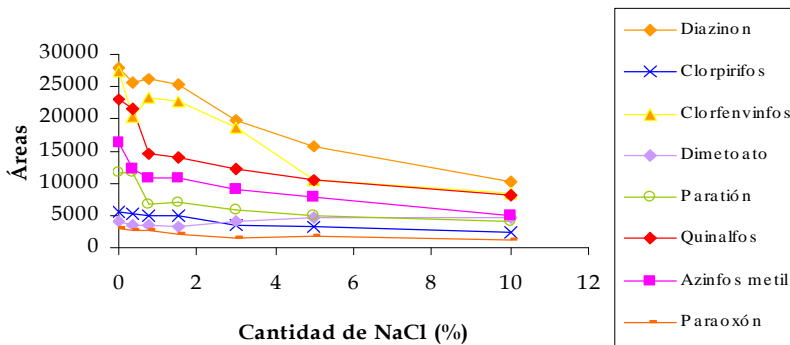


Figura 34: Influencia de la fuerza iónica sobre la cantidad de pesticida extraída en sangre.

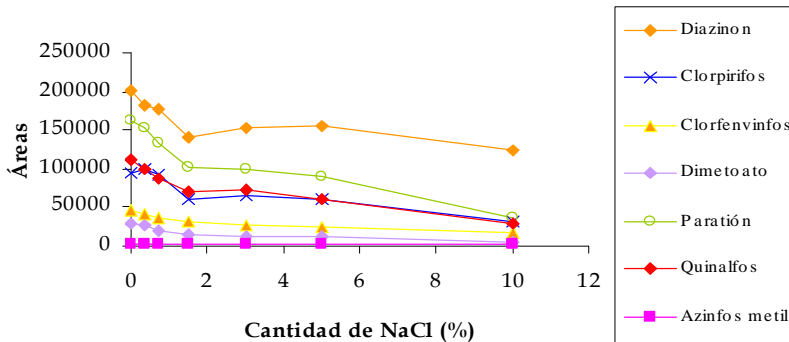


Figura 35: Influencia de la fuerza iónica sobre la cantidad de pesticida extraída en orina.

TRATAMIENTO DE LAS FIBRAS TRAS LA EXTRACCIÓN

Como la muestra de sangre es una matriz compleja, con alto contenido de ácidos grasos y proteínas entre otros componentes, se pensó que un lavado intermedio de la fibra entre la extracción y la desorción podría contribuir a la eliminación de estos componentes no deseables. Se ensayaron diferentes lavados con varias soluciones metanólicas (10, 20 y 50 %) y con agua Milli-Q durante 10 segundos, observándose que el lavado con agua Milli-Q originaba una menor pérdida del analito. Aún así, este tiempo de lavado resultó ser excesivo, ya que se perdían cantidades considerables de analito, por lo que se optó por sumergir la fibra el menor tiempo posible y rápidamente retirarla de la solución de lavado. Este paso de lavado, permite prolongar la semivida de las fibras, ya que impide la formación de una capa de proteínas coaguladas en su superficie, al ser expuestas a la elevada temperatura del inyector, fenómeno que se conoce como "*protein burden*" [7].

8. VIDA MEDIA DE LAS FIBRAS

A medida que el número de inyecciones aumenta, la capacidad de extracción de las fibras disminuye. Sin embargo, este efecto es contrarrestado por el patrón interno, manteniéndose así la reproducibilidad. Las fibras utilizadas en este trabajo tuvieron una vida media de al menos 90 inyecciones reproducibles, tanto en sangre como orina. La excepción fue la determinación de dimetoato en sangre que, por alguna razón que desconocemos, a partir de las 20 a 25 inyecciones, la cantidad de patrón interno extraída se reducía aproximadamente a la mitad.

9. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

La fiabilidad de los resultados analíticos es de crucial importancia en toxicología forense y clínica, ya que constituye un prerrequisito para la interpretación correcta de los resultados toxicológicos [8]. La validación de un método bioanalítico incluye todos los procedimientos necesarios para demostrar su fiabilidad y reproducibilidad para el fin para el que se propone, es decir, la cuantificación de uno o varios analitos en una determinada matriz biológica [9].

Existen varias normas internacionalmente aceptadas para la validación de métodos analíticos y en nuestro caso se siguieron los criterios de la *Food and Drug Administration* (FDA) y de la *International Conference on Harmonisation* (ICH) [9, 10]. De acuerdo con dichos criterios los parámetros estudiados fueron:

- Selectividad
- Curva de calibración
- Precisión y exactitud
- Límites de detección y cuantificación
- Recuperación
- Dilución de las muestras
- Estabilidad

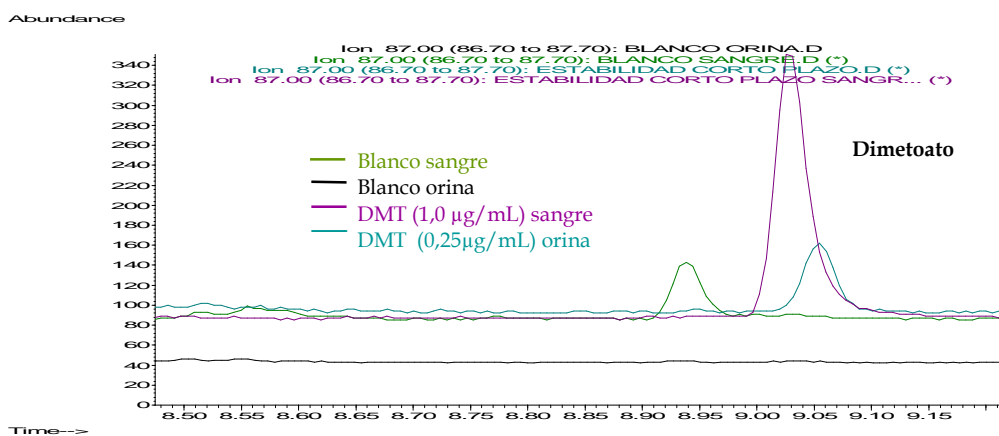
SELECTIVIDAD

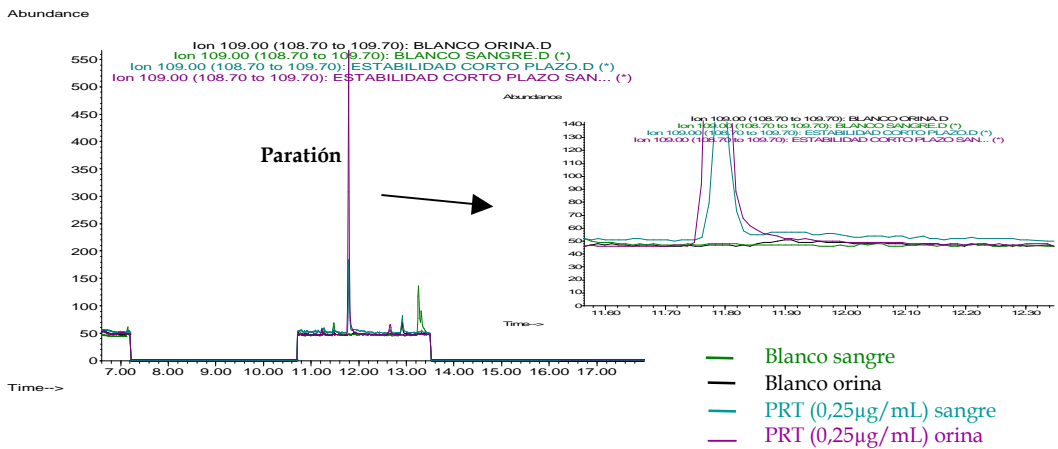
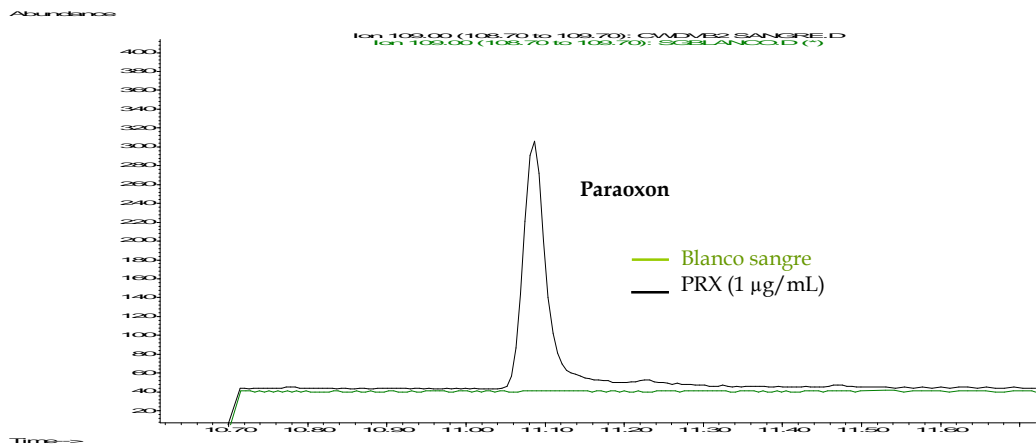
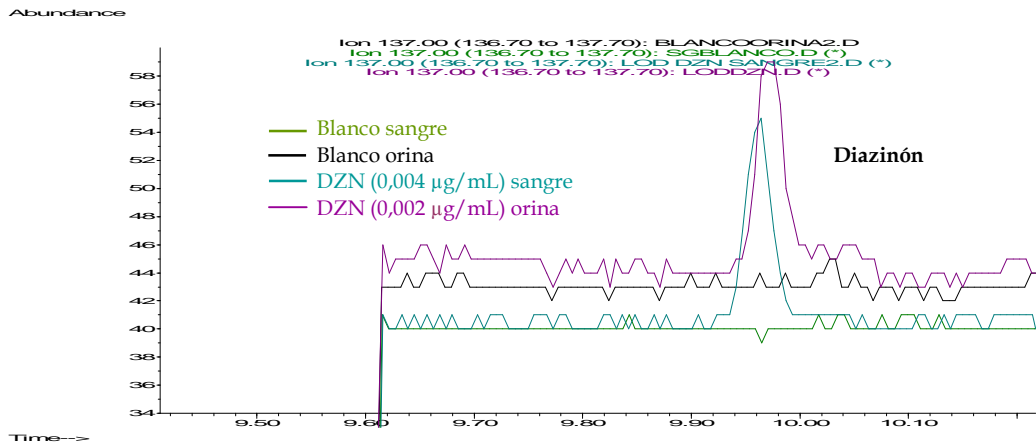
Selectividad (especificidad) es la capacidad de un método analítico de distinguir y determinar inequívocamente los analitos en presencia de otros componentes que eventualmente puedan estar presentes en la muestra. Estos componentes pueden incluir metabolitos, impurezas, otras sustancias, constituyentes de la matriz etc. Existen varios métodos para determinar la selectividad [8].

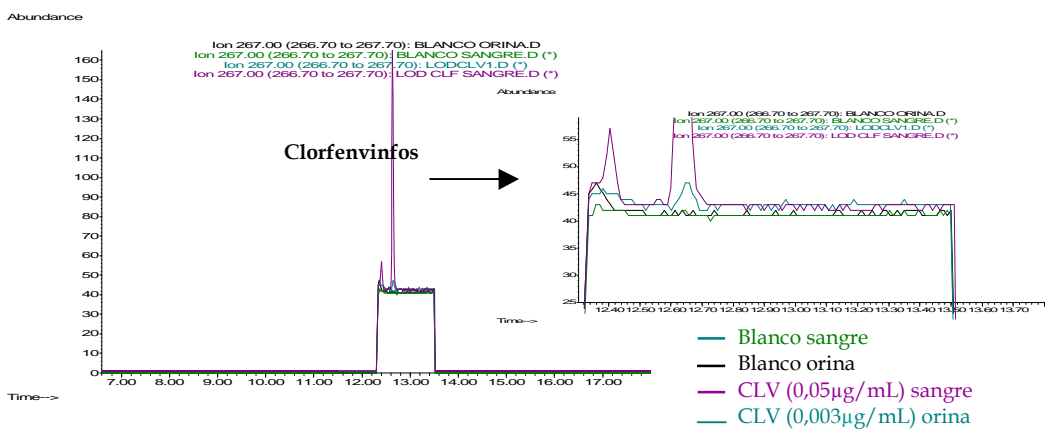
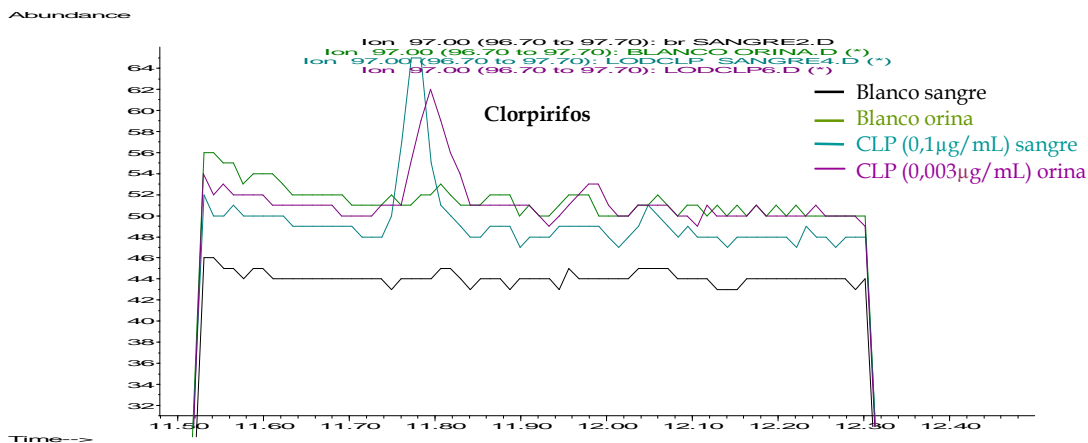
Una manera de establecer la selectividad de un método es demostrar la ausencia de respuesta cromatográfica de una matriz blanca. Habitualmente para calcular este parámetro son analizadas 6 muestras blanco de diferente procedencia, aunque para Dadgar et al. deben ser analizadas de 10 a 20 muestras [11]. Los cromatogramas obtenidos para estas muestras serán cuidadosamente analizados a lo largo de las ventanas de detección que comprendan los tiempos de retención de los analitos de interés [12].

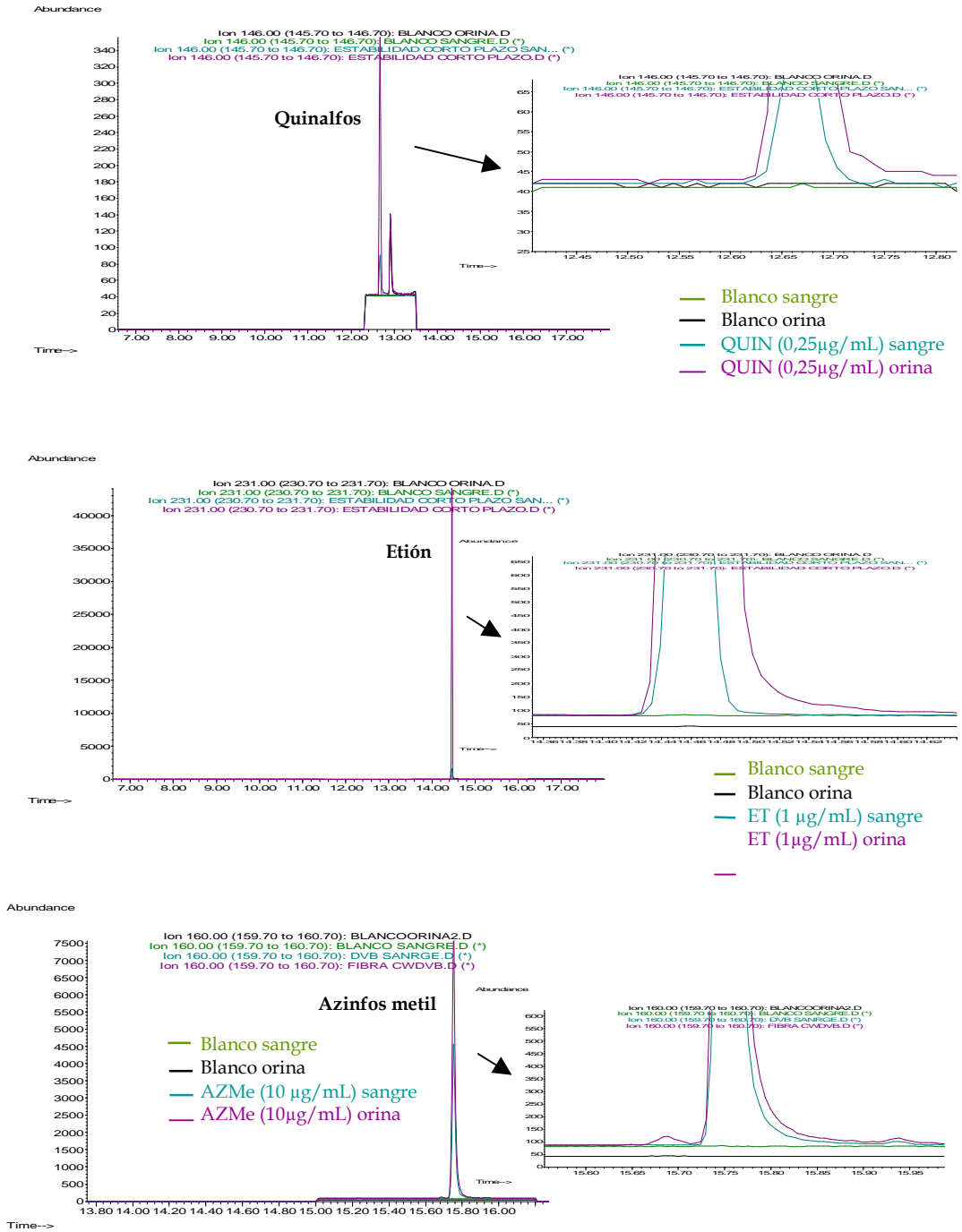
La selectividad de un método destinado a la cuantificación de más de un analito debe ser evaluada para cada uno de los analitos, con el fin de asegurar la ausencia de interferencias [9].

En nuestro caso para comprobar la selectividad de los métodos propuestos fueron analizadas 10 muestras blanco de sangre y orina de distinta procedencia, en las que se comprobó que no existían interferencias en los tiempos de retención e iones seleccionados de los analitos de estudio (Figuras 36-44).









Figuras 36-44: Superposición de cromatogramas (iones cuantificadores) de muestras a las que se añadieron diferentes concentraciones de cada pesticida con muestras blanco.

Asimismo se estudió la selectividad del método desarrollado en presencia de otras sustancias cuya probabilidad de aparecer en muestras reales es considerable o que comparten algunos iones con los pesticidas de estudio. Estas sustancias fueron: cafeína, fentión, forato, azinfos etil, clobazam, cipermetrina, demeton-s-metil, diclorvos, malatión y metil paratión. Para ello cantidades elevadas de estos compuestos fueron adicionadas a muestras de sangre y orina que contenían pequeñas cantidades de cada uno de los analitos. No se observaron interferencias entre estos compuestos y los pesticidas de estudio.

CURVA DE CALIBRACIÓN

La curva de calibración se define como la relación que existe entre la respuesta del instrumento y las concentraciones conocidas de analito. Para cada analito ha de ser calculada una curva de calibración y debe ser preparada en la misma matriz que la del estudio previsto, por adición de concentraciones conocidas de analito. El número de puntos de calibración con los que construir la curva debe de ser suficiente para definir de forma adecuada la relación concentración-respuesta, y en general, deben ser elegidos en función del rango de concentraciones que se espere estudiar.

En todo caso, para la construcción de una curva de calibración deben incluirse una muestra blanco, una muestra únicamente con patrón interno (muestra cero) y como mínimo 5 concentraciones distribuidas por todo el rango estudiado.

El modelo de calibración elegido deberá ser el más simple que describa adecuadamente la relación concentración-respuesta. Si esto no es posible, la utilización de una ecuación de regresión compleja o la selección de un factor de ponderación tendrá que justificarse.

En el desarrollo de una curva de calibración deben verificarse las siguientes condiciones:

- Una desviación de la concentración teórica (bias) $\pm 20\%$ para el punto de calibración más bajo de la curva (límite inferior de cuantificación - LLOQ).
- Una desviación de $\pm 15\%$ para los restantes puntos [9].

Siendo el *bias*, también denominado *error medio relativo*:

$$bias = \frac{(media\ de\ las\ concentraciones\ medidas - valor\ teórico)}{valor\ teórico} \times 100$$

A pesar de que la determinación de pesticidas organofosforados en sangre y orina por microextracción en fase sólida haya sido optimizada para ocho compuestos, únicamente se hizo la validación para los tres que más frecuentemente se encuentran asociados a intoxicaciones forenses en Portugal. Estos pesticidas son el quinalfos, el paration y el dimetoato.

Las curvas de calibración fueron elaboradas a partir de muestras de sangre y orina blanco a las que se añadieron cantidades crecientes de cada uno de los pesticidas (7 réplicas para cada concentración), dentro de los rangos estudiados: 0,05-50 y 0,01-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el quinalfos y paration en sangre y orina respectivamente y 0,5-50 y 0,1-40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el dimetoato en sangre y orina respectivamente. Estos rangos de concentraciones fueron escogidos en función de las concentraciones normalmente asociadas a intoxicaciones mortales. Como se refleja en las Tablas 5-7 no se obtuvo linealidad en la totalidad del rango estudiado, sino que las curvas de calibración tuvieron que ser divididas en dos intervalos de linealidad. En todos los casos los coeficientes de correlación obtenidos fueron de 0,9923 o superiores para la sangre y de 0,9931 o superiores para orina.

Tabla 5. Resultados de la validación de la linealidad del **quinalfos** siguiendo el método empleado.

QUINALFOS (n=7)					
MATRIZ DE ESTUDIO	CONCENTRACIONES DE ESTUDIO (µg/mL)	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (%)	BIAS (%)	ECUACIÓN DE LA RECTA (y= ax+b)	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (R ²)
SANGRE	0,05	0,15	-16,01	y=0,0912x+0,0091 (0,05-5,00 µg/mL)	0,9993
	0,10	2,04	-9,15		
	0,25	18,47	-2,17		
	0,50	12,01	-7,97		
	1,00	7,44	8,65		
	2,50	7,07	-2,80		
	5,00	12,61	-0,68	y=0,1224x-0,1654 (5,00-50,0 µg/mL)	0,9999
	10,0	9,30	0,16		
	15,0	9,69	-1,85		
	25,0	10,02	-0,34		
	35,0	10,32	0,82		
	50,0	12,99	-0,18		
	ORINA	0,01	1,69		
0,02		8,22	-3,86		
0,05		13,09	2,16		
0,10		5,19	-5,58		
0,25		6,17	-1,28		
0,50		3,76	0,13		
1,00		5,44	2,87	y= 0,0318x-0,0057 (0,50-50,0 µg/mL)	0,9991
2,50		2,51	-3,80		
5,00		4,12	-1,35		
10,0		7,62	0,06		
15,0		5,22	-1,07		
20,0		6,60	-0,94		
25,0		6,86	-1,37		
30,0		5,75	2,89		
35,0		7,18	2,79		
40,0		1,68	-2,05		
50,0	3,08	-0,46			

Tabla 6. Resultados de la validación de la linealidad del **paratión** siguiendo el método empleado.

PARATIÓN (n=7)					
MATRIZ DE ESTUDIO	CONCENTRACIONES DE ESTUDIO (µg/mL)	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (%)	BIAS (%)	ECUACIÓN DE LA RECTA (y= ax+b)	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (R ²)
SANGRE	0,05	9,24	-9,79	y=0,0507x+0,001 (0,05-5,00 µg/mL)	0,9999
	0,10	6,25	18,30		
	0,25	9,45	-3,98		
	0,50	6,16	-4,52		
	1,00	11,55	0,55		
	2,50	14,16	0,87	y=0,0898x-0,1825 (5,00-50,0 µg/mL)	0,9982
	5,00	10,85	-0,20		
	10,0	5,46	-6,33		
	25,0	8,22	5,26		
	35,0	12,26	-0,18		
50,0	8,27	-0,94			
ORINA	0,01	5,68	5,41	y=0,0180x+7E-0,5 (0,01-1,00 µg/mL)	0,9954
	0,02	4,24	-18,71		
	0,05	3,31	6,58		
	0,10	3,35	-3,36		
	0,25	5,71	7,75		
	0,50	5,66	-0,32		
	0,80	10,64	-6,64		
	1,00	3,01	0,57	y=0,0264x-0,079 (1,00-50,0 µg/mL)	0,9980
	2,50	3,73	-6,71		
	5,00	6,07	-4,58		
	10,0	4,38	5,83		
	15,0	6,01	-1,17		
	25,0	5,72	2,80		
	40,0	5,58	-4,11		
50,0	7,53	1,89			

Tabla 7. Resultados de la validación de la linealidad del **dimetoato** siguiendo el método empleado.

DIMETOATO (n=7)					
MATRIZ DE ESTUDIO	CONCENTRACIONES DE ESTUDIO (µg/mL)	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (%)	BIAS (%)	ECUACIÓN DE LA RECTA (y= ax+b)	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (R ²)
SANGRE	0,50	12,91	-11,43	y=0,0043x+0,002 (0,50-10,0 µg/mL)	0,9996
	1,00	4,87	0,01		
	2,50	6,86	4,86		
	5,00	9,45	-1,48		
	10,0	13,38	0,12		
	15,0	5,00	-3,26	y=0,0043x-0,0027 (10,0-50,0 µg/mL)	0,9923
	25,0	5,86	-8,28		
	35,0	0,87	4,17		
	50,0	11,52	-0,26		
ORINA	0,10	10,50	10,54	y=0,0046x+4E-0,5 (0,10-1,00 µg/mL)	0,9994
	0,25	0,94	-2,69		
	0,50	4,37	-2,08		
	0,80	14,49	-0,64		
	1,00	0,49	0,68		
	2,50	7,68	7,18		
	5,00	6,94	-9,64	y=0,0052x-0,001 (1,00-40,0 µg/mL)	0,9957
	10,0	1,76	-14,00		
	15,0	8,66	13,08		
	25,0	4,56	0,56		
	35,0	8,39	-2,25		
	40,0	4,81	0,60		

Es necesario destacar dos aspectos importantes en el caso del dimetoato, por una parte no se consiguió disminuir el punto más bajo de la curva de calibración en sangre, y esto es debido a que el dimetoato posee la peor señal cromatográfica de todos los pesticidas estudiados.

Por otro lado, la curva de calibración en orina, fue construida a temperatura ambiente y no a 90 °C como sucedió con el resto de los pesticidas, ya que a esa temperatura los valores obtenidos tras la extracción para cada nivel de concentración eran muy variables.

PRECISIÓN Y EXACTITUD

La *precisión* de un método analítico describe la proximidad de las medidas individuales de analito cuando el procedimiento es aplicado repetidamente a múltiples alícuotas de un mismo volumen homogéneo de una matriz [8-10].

Puede subdividirse en: **precisión intradía o repetibilidad** que expresa la precisión durante el procesamiento de una secuencia analítica en un corto período de tiempo, y **precisión interdía o reproducibilidad** que refleja la precisión en el tiempo, y puede implicar a diferentes analistas, equipos, reactivos e, incluso, laboratorios [9].

La precisión se debe medir usando un mínimo de cinco determinaciones por cada concentración, aplicadas a su vez a tres niveles de concentración dentro del rango de la curva de calibración.

Según los criterios de validación por nosotros adoptados, la precisión calculada para cada nivel de concentración no debe exceder el 15% de coeficiente de variación (CV) excepto para el LLOQ, donde no debe exceder el 20% del CV.

La *exactitud* de un método analítico describe la proximidad entre los resultados de la concentración medida por el método analítico con respecto al valor verdadero o teórico (concentración) del analito. La exactitud se determina mediante el análisis de replicados de las muestras que contienen cantidades conocidas de analito [9]. Debe ser calculada utilizando un mínimo de cinco determinaciones por cada concentración, siendo tres el mínimo de concentraciones dentro de la gama de concentraciones prevista.

La exactitud calculada para cada nivel de concentración debe de estar dentro del intervalo de $\pm 15\%$ con respecto al valor real, a excepción del LLOQ, donde no debe de superar el 20%.

Para el cálculo de los valores de precisión y exactitud de nuestros métodos, se efectuaron mediciones en el mismo día (ensayos intradía) y en días diferentes (ensayos interdía). Los valores obtenidos para la precisión se expresaron como coeficiente de variación y los valores de exactitud como *bias*.

○ ENSAYOS INTRADÍA

Para el cálculo de los parámetros intradía se escogieron entre 5 y 6 niveles de concentración, y para cada nivel seleccionado se realizó el análisis por sextuplicado. Como se observa en las Tablas 8-10, tanto la precisión como la exactitud intradía para sangre y orina se situaron dentro de los valores considerados como aceptables.

Tabla 8. Resultados del estudio de la precisión intradía y exactitud del **quinalfos**.

QUINALFOS - ENSAYOS INTRADÍA (n=6)				
MATRIZ DE ESTUDIO	CONCENTRACIÓN AÑADIDA (µg/mL)	CONCENTRACIÓN MEDIDA (µg/mL)	PRECISIÓN (CV %)	EXACTITUD (BIAS %)
SANGRE	0,25	0,25	9,13	2,01
	2,50	2,54	4,22	1,63
	10,0	10,47	8,33	4,73
	25,0	23,46	7,86	-6,17
	50,0	53,35	5,63	6,70
ORINA	0,05	0,04	13,09	-14,61
	0,50	0,54	3,06	8,61
	2,50	2,35	4,02	-6,01
	10,0	9,51	2,92	-4,86
	25,0	24,73	3,05	-1,09
	50,0	51,43	1,55	2,85

Tabla 9. Resultados del estudio de la precisión intradía y exactitud del **paratión**.

PARATIÓN - ENSAYOS INTRADÍA (n=6)				
MATRIZ DE ESTUDIO	CONCENTRACIÓN AÑADIDA (µg/mL)	CONCENTRACIÓN MEDIDA (µg/mL)	PRECISIÓN (CV %)	EXACTITUD (BIAS %)
SANGRE	0,25	0,25	1,75	1,87
	2,50	2,32	1,82	-7,27
	10,0	9,65	2,98	-3,50
	25,0	26,80	3,20	7,20
	50,0	52,08	1,04	4,17
ORINA	0,05	0,05	3,31	6,58
	0,10	0,09	3,35	-3,36
	0,50	0,50	4,65	-0,33
	2,50	2,43	1,78	-6,21
	10,0	10,05	3,97	4,86
	50,0	51,91	6,02	3,82

Tabla 10. Resultados del estudio de la precisión intradía y exactitud del **dimetoato**.

DIMETOATO - ENSAYOS INTRADÍA (n=6)				
MATRIZ DE ESTUDIO	CONCENTRACIÓN AÑADIDA (µg/mL)	CONCENTRACIÓN MEDIDA (µg/mL)	PRECISIÓN (CV %)	EXACTITUD (BIAS %)
SANGRE	0,50	0,51	7,25	2,74
	5,00	4,70	5,89	-5,93
	10,0	10,64	6,45	6,49
	25,0	21,70	5,77	-13,28
	50,0	49,87	11,52	-0,26
ORINA	0,10	0,11	7,99	8,76
	0,50	0,49	11,08	-1,78
	2,50	2,64	6,24	5,54
	10,0	8,86	5,30	-11,43
	40,0	40,09	3,48	0,22

○ ENSAYOS INTERDÍA

En este caso se mantuvieron los mismos niveles de concentración que para el cálculo de los parámetros intradía, y cada nivel de concentración también se analizó por sextuplicado. Los ensayos se efectuaron entre los 2 y los 10 meses por diferentes analistas. Los valores de precisión fueron inferiores a 14% al igual que

la exactitud que fue inferior a 15% para todos los pesticidas, siendo ambos considerados como valores aceptables según los criterios anteriormente citados (Tablas 11-13).

Tabla 11. Resultados del estudio de la precisión interdía y exactitud del **quinalfos**.

QUINALFOS - ENSAYOS INTERDÍA (n=6)				
MATRIZ DE ESTUDIO	CONCENTRACIÓN AÑADIDA (µg/mL)	CONCENTRACIÓN MEDIDA (µg/mL)	PRECISIÓN (CV %)	EXACTITUD (BIAS %)
SANGRE	0,25	0,27	9,67	10,52
	2,50	2,36	8,60	-5,53
	10,0	9,56	7,89	-4,41
	25,0	27,10	2,28	8,39
	50,0	45,09	6,67	-9,82
ORINA	0,05	0,05	4,68	1,10
	0,50	0,53	8,69	6,67
	2,50	2,33	5,48	-6,66
	10,0	9,78	2,15	-2,21
	25,0	24,41	5,77	-2,35
	50,0	50,08	3,54	0,17

Tabla 12. Resultados del estudio de la precisión interdía y exactitud del **paratión**.

PARATIÓN - ENSAYOS INTERDÍA (n=6)				
MATRIZ DE ESTUDIO	CONCENTRACIÓN AÑADIDA (µg/mL)	CONCENTRACIÓN MEDIDA (µg/mL)	PRECISIÓN (CV %)	EXACTITUD (BIAS %)
SANGRE	0,25	0,26	1,21	2,41
	2,50	2,42	5,67	-3,33
	10,0	9,08	4,69	-9,16
	25,0	27,89	6,34	11,59
	50,0	46,26	5,03	-7,47
ORINA	0,05	0,04	12,60	-9,36
	0,10	0,09	9,79	-8,20
	0,50	0,54	6,91	7,82
	2,50	2,43	2,96	-2,65
	10,0	9,97	5,94	-0,28
	50,0	47,92	6,60	-4,15

Tabla 13. Resultados del estudio de la precisión interdía y exactitud del **dimetoato**.

DIMETOATO - ENSAYOS INTERDÍA (n=6)				
MATRIZ DE ESTUDIO	CONCENTRACIÓN AÑADIDA (µg/mL)	CONCENTRACIÓN MEDIDA (µg/mL)	PRECISIÓN (CV %)	EXACTITUD (BIAS %)
SANGRE	0,50	0,47	9,97	-6,36
	5,00	5,10	8,01	2,09
	10,0	9,53	12,55	-4,66
	25,0	28,20	8,68	12,81
	50,0	57,26	13,32	14,53
ORINA	0,10	0,11	6,81	9,78
	0,50	0,53	12,44	7,56
	2,50	2,66	4,36	6,39
	10,0	9,31	9,13	-6,91
	40,0	40,99	10,13	2,47

LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

El límite inferior de cuantificación (LLOQ) se define como la menor cantidad de analito en la muestra que puede ser cuantificada con precisión y exactitud. Existen varias formas de calcular este parámetro, en nuestro caso se consideró el LLOQ como aquel que cumple las siguientes condiciones [9]:

- La respuesta del analito en el LLOQ debe de ser por lo menos 5 veces superior a la respuesta del blanco.
- El pico del analito (respuesta) debe de ser identificable, discreto, y reproducible con una precisión del 20% y una exactitud comprendida entre 80 y 120%.

De acuerdo con la ICH [10], el límite de detección (LOD) se define como la menor cantidad de analito en la muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada. Consideramos como LOD la menor concentración de analito que alcanza un valor superior a tres veces la relación señal/ruido. Fue

calculada de forma empírica mediante el análisis de concentraciones decrecientes de analito en la muestra.

En la Tabla 14 se detallan ambos parámetros relativos a las muestras de sangre y orina para cada pesticida.

Tabla 14. Resultados de los LOD y LLOQ de los ocho pesticidas de estudio.

COMPUESTO	MATRIZ DE ESTUDIO	LOD (ng/mL) n=7	LLOQ (ng/mL) n=7
QUINALFOS	SANGRE	10	50
	ORINA	2	10
PARATIÓN	SANGRE	25	50
	ORINA	3	10
DIMETOATO	SANGRE	200	500
	ORINA	50	100
CLORFENVINFOS ¹	SANGRE	4	
	ORINA	3	
DIAZINÓN	SANGRE	4	
	ORINA	2	
PARAOXON	SANGRE	50	
	ORINA	---	
CLORPIRIFOS	SANGRE	100	
	ORINA	3	
AZINFOS METIL	SANGRE	250	
	ORINA	30	

Estos límites de detección y cuantificación obtenidos son aparentemente elevados, pero hay que tener en cuenta que la cantidad de muestra utilizada en este trabajo fue únicamente de 100 µL. De este modo, ambas metodologías se revelaron suficientemente sensibles para la determinación de pesticidas organofosforados en muestras reales de sangre y orina.

También es necesario recordar que el estudio efectuado en los cinco últimos pesticidas representados en la Tabla 14 fue a nivel cualitativo y no cuantitativo.

¹ Los límites de detección se refieren al isómero Z, que es el más activo fisiológicamente [13, 14].

En el caso del paraoxon, como hemos dicho anteriormente no se efectuó el estudio en orina ya que este metabolito se transforma rápidamente en p-nitrofenol [15].

RECUPERACIÓN

La recuperación o rendimiento de extracción de un analito es la relación porcentual entre la respuesta del detector obtenida a partir de una cantidad de analito añadido y posteriormente extraído de la matriz biológica, en comparación con la respuesta de ese mismo detector para la concentración verdadera de la sustancia estándar pura. La recuperación informa de la eficacia de la extracción de un método analítico dentro de unos límites de variabilidad. La recuperación del analito no necesita ser del 100%, pero sí debe ser constante, precisa y reproducible [9].

Algunos autores consideran que la recuperación no es un parámetro esencial en la validación de un método analítico, si la precisión, exactitud, LLOQ y especialmente el LOD son adecuados [8].

Para determinar la recuperación de los métodos descritos, se analizaron tres concentraciones diferentes (una baja, una media y una alta) por sextuplicado, y las áreas de los picos obtenidos tras la extracción fueron comparadas con las obtenidas por inyección de 1 μL de las soluciones metanólicas (de una concentración 50 veces inferior) de cada uno de los pesticidas. Dado que la cantidad de cada uno de los pesticidas presente en las disoluciones metanólicas era 50 veces más baja que la teóricamente extraída por la fibra (si la recuperación del analito fuese del 100%), fue necesario multiplicar las áreas de las disoluciones metanólicas por dicho factor. De esta forma, la recuperación se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Recuperación} = \frac{\text{Área del pico obtenido por SPME}}{\text{Área del pico de la disolución metanólica} \times 50} \times 100$$

En todos los casos el rendimiento de extracción fue aceptable (Tablas 15-17) teniendo en cuenta que con SPME los valores de recuperación son normalmente mucho más bajos que empleando otras técnicas de extracción [2]. No obstante, el hecho de que en esta técnica toda la cantidad de analito extraída es inyectada en el cromatógrafo hace que compense esta baja recuperación.

Tabla 15. Estudio de la recuperación del **quinalfos** en sangre y orina.

QUINALFOS (n=6)			
MATRIZ DE ESTUDIO	CONCENTRACIÓN AÑADIDA (µg/mL)	RECUPERACIÓN (%)	S.D.*
SANGRE	0,50	14,13	0,99
	5,00	16,90	0,40
	25,0	12,45	1,21
ORINA	0,50	27,70	5,46
	5,00	26,62	1,92
	25,0	24,47	2,42

* S.D. (desviación estándar)

Tabla 16. Estudio de la recuperación del **paratión** en sangre y orina.

PARATIÓN (n=6)			
MATRIZ DE ESTUDIO	CONCENTRACIÓN AÑADIDA (µg/mL)	RECUPERACIÓN (%)	S.D.
SANGRE	0,50	6,69	2,02
	5,00	6,60	1,26
	25,0	6,45	0,40
ORINA	0,50	45,64	4,45
	5,00	37,62	6,12
	25,0	21,93	0,79

Tabla 17. Estudio de la recuperación del **dimetoato** en sangre y orina.

DIMETOATO (n=6)			
MATRIZ DE ESTUDIO	CONCENTRACIÓN AÑADIDA (µg/mL)	RECUPERACIÓN (%)	S.D.
SANGRE	0,50	0,67	0,09
	5,00	0,57	0,19
	25,0	0,25	0,08
ORINA	0,50	2,47	0,14
	5,00	0,89	0,02
	25,0	0,38	0,02

EFFECTO DE LA DILUCIÓN DE LA MUESTRA

En ocasiones, durante la realización de un análisis toxicológico en muestras reales que llegan al laboratorio, se obtienen resultados que están por encima del rango de la curva de calibración establecida. En estos casos debe efectuarse una dilución de la muestra y volver a repetir el análisis [9, 16]. También es frecuente que la cantidad de muestra enviada para efectuar el análisis sea inferior a la establecida por nuestro procedimiento de validación. En estos casos, es necesario completarla con la misma matriz biológica exenta de analito, hasta el volumen exacto descrito en nuestro procedimiento. Este factor es especialmente importante cuando se trabaja con SPME, ya que los volúmenes finales deben de ser constantes [3].

Para validar este parámetro, se hicieron varias réplicas de muestras que fueron diluidas con la misma matriz biológica exenta de analito, utilizando diferentes factores de dilución ($1/2$, $1/4$, $1/10$). Se escogieron concentraciones superiores al rango de la curva de calibración, de forma a que una vez efectuada la dilución, éstas entraran dentro del rango de linealidad, y así se demostrase la exactitud de la dilución. No se estudiaron factores de dilución superiores a $1/10$, ya que en

este caso el volumen de muestra a utilizar sería de 10 μL , y volúmenes inferiores a éste son difíciles de medir con precisión (Tabla 18).

Tabla 18. Factores de dilución de la muestra analizados.

MUESTRA (POF; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	FACTOR DE DILUCIÓN		
	1/2	1/4	1/10
VOLUMEN DE MUESTRA (μL)	50	25	10
VOLUMEN DE MATRIZ BLANCO (μL)	50	75	90

También fueron realizadas varias réplicas de muestras que, una vez diluidas, tenían una concentración de analito próxima al LLOQ, pero no inferior. En este caso el volumen parcial de muestra se incrementó con la adición de matriz blanca y se procedió a su análisis de la forma habitual.

Los valores de precisión y exactitud obtenidos para el dimetoato, paration y quinalfos en muestras de sangre y orina, tras ser multiplicados por el factor de dilución correspondiente, fueron inferiores a 13% (CV), siendo considerados como aceptables [11].

ESTABILIDAD

La estabilidad de una sustancia en un fluido biológico está en función de las condiciones de almacenamiento, de las propiedades de la sustancia en cuestión, de la matriz en que se encuentra, y del tipo de envase. Los procedimientos de control de la estabilidad deben evaluar:

- La estabilidad del analito durante la recogida de la muestra y manipulación.
- Tras largos períodos de almacenamiento (congelación a la temperatura prevista de almacenamiento).
- Tras períodos cortos a la temperatura de trabajo en el laboratorio.

- Estabilidad a ciclos de congelación-descongelación.

Para todas las determinaciones de estabilidad se debería utilizar una serie de muestras preparadas a partir de soluciones recientes de analito en la matriz biológica carente de los propios analitos. Las soluciones estándar del analito deben estar preparadas en un solvente apropiado y a una concentración conocida [9, 17].

- ESTABILIDAD DE LAS SOLUCIONES ESTÁNDAR

Tal como referimos, las soluciones madre fueron guardadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en ausencia de luz. Bajo estas condiciones se mantuvieron estables durante al menos seis meses.

- ESTABILIDAD DE LOS ANALITOS EN MUESTRAS PROCESADAS

La estabilidad de los analitos en muestras procesadas fue estudiada en dos niveles de concentración para cada matriz (0,25 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, excepto el dimetoato en sangre, cuya concentración más baja fue de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para eso, tras la extracción de las muestras durante 60 minutos, sólo se desorbió la fibra transcurridos intervalos de tiempo variables (5, 10, 15, 20 y 30 minutos), y se compararon con muestras analizadas inmediatamente tras la extracción. Los analitos se mantuvieron estables en la cubierta de la fibra por lo menos durante 30 minutos para ambas matrices.

- ESTABILIDAD DE LOS ANALITOS TRAS PERÍODOS CORTOS A LA TEMPERATURA DE TRABAJO EN EL LABORATORIO

La estabilidad de los analitos a la temperatura de trabajo en el laboratorio fue evaluada a dos niveles de concentración (0,25 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; excepto el dimetoato en sangre, cuya concentración más baja fue de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para ello las muestras de sangre y orina adicionadas de los pesticidas (a excepción del patrón interno) fueron dejadas a la temperatura de trabajo en el laboratorio durante 24 horas. Transcurrido este intervalo de tiempo, fueron analizadas normalmente, y los resultados obtenidos se compararon con los de las muestras preparadas y analizadas en el mismo día. Las concentraciones de los pesticidas no se desviaron más de 15% de la concentración verdadera.

- ESTABILIDAD A CICLOS DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN.

La estabilidad de los analitos a ciclos de congelación-descongelación fue evaluada a dos niveles de concentración (0,25 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; excepto el dimetoato en sangre, cuya concentración más baja fue de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para ello las muestras de sangre y orina adicionadas de los pesticidas (a excepción del patrón interno) fueron congeladas entre 12-24 horas, y posteriormente descongeladas y mantenidas durante 2 horas a la temperatura del laboratorio. Este proceso se repitió 2 veces más. Transcurridos los 3 ciclos, las muestras fueron analizadas normalmente, y los resultados obtenidos se compararon con los de las muestras preparadas y analizadas en el mismo día. Las concentraciones de los pesticidas para ambas matrices no se desviaron más del 11% de la concentración verdadera.

10. APLICAÇÃO A CASOS CLÍNICOS E FORENSES

Após a validação dos métodos propostos, estes foram aplicados a amostras reais procedentes do Serviço de Toxicologia Forense da Delegação de Coimbra do Instituto Nacional de Medicina Legal (STF-DC-INML). Estas amostras pertencem a casos de intoxicação por pesticidas organofosforados, tanto a nível postmortem, como hospitalar, desde o ano 1999 até à actualidade.

O facto da toxicidade destas substâncias ser muito elevada, bem como os propósitos suicidas com que normalmente são ingeridas, tornam óbvio o número de amostras respeitantes a situações postmortem superar largamente o das situações hospitalares. Deste modo, não será igualmente estranho o facto de que em muitos dos casos analisados não dispusemos de amostra de urina, quer por não ser uma amostra normalmente colhida durante as autópsias médico-legais em caso de intoxicação por organofosforados, quer por ser uma amostra muitas vezes não disponível no cadáver, devido ao relaxamento dos esfíncteres que ocorre após a morte.

Por outro lado, as amostras de âmbito hospitalar são armazenadas no STF-DC-INML por um tempo inferior ao das restantes amostras, o que levou a que, aquando da realização deste trabalho, algumas das amostras referentes a casos hospitalares já tivessem sido destruídas.

Os resultados analíticos obtidos após aplicação das metodologias analíticas que agora propomos a 78 casos (99 amostras) encontram-se descritos nas páginas seguintes:

NÚMERO CASO	PROCEDÊNCIA	PESTICIDA	AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	Tomar (GML)	Paratião	sangue	> 500
2	Abrantes (GML)	Dimetoato	sangue	116,36
			urina	1,83
3	Viseu (GML)	Paratião	sangue	0,07
			urina	< LOQ
4	Guarda (GML)	Dimetoato	sangue	124,79
			urina	41,54
5	Viseu (GML)	Quinalfos Paratião	sangue	> 500 482,52
6	ST-DC-INML	Dimetoato	sangue	< LOQ
7	HUC	Dimetoato	sangue	7,59
			urina	0,52
8	Leiria (GML)	Dimetoato	sangue	8,60
			urina	1,30
9	Funchal	Dimetoato	sangue	5,10
			urina	0,37
10	Viseu (GML)	Quinalfos	sangue	0,37
11	Tomar (GML)	Paratião	sangue	243,11
12	Fig. Foz (GML)	Paratião	sangue	2,07
13	Funchal	Dimetoato	sangue	8,81
14	A. Heroísmo (GML)	Dimetoato	sangue	< LOD
			urina	< LOD
15	ST-DC-INML	Dimetoato	sangue	118,21
16	Hospital Aveiro	Quinalfos	sangue	0,34
			urina	0,28
17	STF-DP-INML	Quinalfos	sangue	0,12
18	Fig. Foz (GML)	Quinalfos	sangue	0,14
19	ST-DC-INML	Paratião	sangue	0,24

(Continuação)				
NÚMERO CASO	PROCEDÊNCIA	PESTICIDA	AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
20	ST-DCINML	Quinalfos	sangue	31,65
			urina	0,35
21	Viseu (GML)	Quinalfos	sangue	34,23
22	ST-DCINML	Paratião	sangue	< LOD
23	ST-DCINML	Quinalfos	sangue	3,95
24	Aveiro	Quinalfos	sangue	0,48
25	ST-DCINML	Dimetoato	sangue	487,22
			urina	20,49
26	Leiria (GML)	Paratião	sangue	18,85
			urina	0,05
27	Viseu (GML)	Quinalfos	sangue	123,11
28	Viseu (GML)	Quinalfos	sangue	0,15
29	Viseu (GML)	Quinalfos	sangue	< LOQ
30	Fig. Foz (GML)	Paratião	sangue	> 500
31	Fig. Foz (GML)	Quinalfos	sangue	2,46
32	Viseu (GML)	Dimetoato	sangue	79,71
33	Sertã	Quinalfos	sangue	0,55
34	Leiria (GML)	Paratião	sangue	> 500
35	ST-DCINML	Quinalfos	sangue	0,74
36	Guarda	Paratião	sangue	3,43
37	Sta Comba Dão	Quinalfos	sangue	5,12
			urina	0,04
38	Leiria (GML)	Paratião	sangue	> 500
39	Guarda	Quinalfos	sangue	312,68

<i>(Continuação)</i>				
NÚMERO CASO	PROCEDÊNCIA	PESTICIDA	AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
40	P. Delgada (GML)	Quinalfos	urina	< LOD
41	Vagos	Quinalfos	sangue	0,68
			urina	0,12
42	Castelo Branco	Quinalfos	sangue	< LOQ
43	Viseu (GML)	Quinalfos	sangue	0,78
			urina	201,07
44	Tomar	Quinalfos	sangue	1,12
45	Viseu (GML)	Dimetoato	sangue	163,39
46	Fig. Foz (GML)	Dimetoato	sangue	142,90
47	M. da Beira	Paratião	sangue	1,26
48	Aveiro	Paratião	sangue	0,58
49	ST-DC-INML	Quinalfos	sangue	0,52
50	ST-DC-INML	Quinalfos	sangue	0,93
51	Aveiro	Dimetoato	sangue	82,70
52	Torres Novas	Paratião	sangue	0,66
53	ST-DC-INML	Quinalfos	sangue	0,55
54	Ourém	Quinalfos	sangue	0,20
55	Moimenta da Beira	Paratião	sangue	0,33
56	Hospital Aveiro	Quinalfos	sangue	0,13

(Continuação)				
NÚMERO CASO	PROCEDÊNCIA	PESTICIDA	AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
57	Pombal	Paratião	sangue	1,44
			urina	4,76
58	ST-DC-INML	Quinalfos	sangue	0,99
			urina	0,29
59	Aveiro	Quinalfos	sangue	0,41
60	ST-DC-INML	Paratião	sangue	0,30
61	Muimenta da Beira	Quinalfos	sangue	0,82
62	Gouveia	Quinalfos	sangue	0,43
63	Alvaiázere	Quinalfos	sangue	0,20
			urina	1,29
64	Leiria	Paratião	sangue	1,52
65	Castelo Branco	Dimetoato	sangue	51,77
66	Mangualde	Quinalfos	sangue	0,08
67	ST-DC-INML	Paratião	sangue	<LOQ
68	ST-DC-INML	Paratião	sangue	18,44
			urina	< LOD
69	ST-DC-INML	Paratião	sangue	< LOQ
			urina	< LOD
70	Viseu	Quinalfos	sangue	0,09
71	Águeda	Quinalfos	sangue	< LOQ

<i>(Continuação)</i>				
NÚMERO CASO	PROCEDÊNCIA	PESTICIDA	AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
72	Marinha Grande	Paratião	sangue	1,26
73	ST-DC-INML	Paratião	sangue	< LOD
74	Montemor-o-Velho	Paratião	sangue	11,17
75	S. Pedro do Sul	Quinalfos	sangue	1,96
			urina	0,42
76	ST-DC-INML	Dimetoato	sangue	6,77
77	Leiria (GML)	Paratião	sangue	1,02
78	ST-DCINML	Quinalfos	sangue	< LOQ
			urina	0,03

GML (Gabinete Médico-Legal); **ST-DC-INML** (Serviço de Tanatologia-Delegação de Coimbra do Instituto Nacional de Medicina Legal); **HUC** (Hospitais da Universidade de Coimbra); **STF-DP-INML** (Serviço de Toxicologia Forense-Delegação do Porto do Instituto Nacional de Medicina Legal).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Dien K, Lentner C. Tablas científicas. Basel: Ciba-Geigy S.A.; 1975, p. 284-288.
- [2] Ulrich S. SPME in biomedical analysis. *J Chromatogr A* 2000; 902: 167-194.
- [3] Pawliszyn J. Solid phase microextraction: Theory and practice. New York: Wiley-VCH; 1997.
- [4] Supelco. Solid phase microextraction troubleshooting guide. Bulletin 928. [documento online] 2001 [consultado em 2001 Oct. 16]. Disponible en: URL: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/11200/11122.pdf>.
- [5] Supelco. SPME/GC for forensic applications: Explosives, fire debris, and drugs of abuse. Bulletin 922. [documento online] 1998 [consultado en 2001 Oct 16]. Disponible en: URL: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4546.pdf>.
- [6] Barroso M, Gallardo E, Margalho C, Ávila S, Pinho Marques E, Vieira DN, et al. Application of solid phase microextraction to the determination of strychnine in blood. *J Chromatogr B* 2005; 816:29-34.
- [7] Mills GA, Walker V. Review: Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. *J Chromatogr A* 2000; 902: 267-268.
- [8] Peters FT, Maurer HH. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - a review. *Accredit Qual Assur* 2002; 7: 441-449.
- [9] Food and Drug Administration: U.S. Department of Health and Human Services. Guidance for industry, bioanalytical method validation. [documento online] 2001 [consultado 2003 En 10]. Disponible en: URL: <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>.
- [10] International Conference on Harmonization (ICH). Validation of analytical methods: Methodology ICH Q2 B. [documento online] 1996 [consultado 2003 En

- [10]. Disponible en: URL: http://www.ich.org/MediaServer.jserv?@_ID=4188@_MODE=GLB.
- [11] Dadgar D, Burnett PE, Choc MG, Gallicano K, Hooper JW. Application issues in bioanalytical method validation, sample analysis and data reporting. *J Pharm Biomed Anal* 1995; 13 (2): 89-97.
- [12] Bresolle F, Bromet-Petit M, Audran M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *J Chromatogr B* 1996; 686 (1):3-10.
- [13] National Registration Authority (Australia) Review of Chlorfenvinphos 2000 - Chemistry Assessment. [documento online] [consultado 2005 Oct 10]. Disponible en: URL: <http://www.nra.gov.au/chemrev/cfvpchem.html>
- [14] Tomkins BA, Ilgner RH. Determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in ground water using solid-phase microextraction (SPME) followed by gas chromatography with selected-ion monitoring. *J Chromatogr A* 2002; 972: 183-194
- [15]. Baselt RC. Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 7th ed. Foster City: Biomedical Publications; 2004.
- [16] Buik AR, Doig MV, Jeal SC, Land GS, McDowall RD. Method validation in the bioanalytical laboratory. *J Pharm Biomed Anal* 1990; 8: 629-637.
- [17] Dadgar D, Burnett P. Issues in evaluation of bioanalytical method selectivity and drug stability. *J Pharm Biomed Anal* 1995; 14: 23-31.

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN

LA ELECCIÓN DE LOS PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS COMO SUSTANCIAS DE INTERÉS

Los organofosforados han sido, desde su descubrimiento en 1854, el grupo de pesticidas más usado, y que han supuesto una alternativa al resto de biocidas. Su baja persistencia ha constituido el elemento fundamental de su enorme potencial de uso [1]. Se calcula que existen unas 40.000 moléculas sintetizadas, de las cuales unas 200 han sido comercializadas [2].

Como consecuencia de su amplia comercialización, y por tanto de su uso, a veces indiscriminado, han aparecido toda una serie de fenómenos tóxicos atribuidos en algunos casos a su mala utilización, y en los más, a la elevada toxicidad intrínseca de estas sustancias. Esto ha determinado la necesidad de establecer mecanismos de control, velando por su correcta utilización y tratando de minimizar los riesgos de exposición.

Según datos de la OMS, anualmente se intoxican dos millones de personas por exposición directa o indirecta a plaguicidas. De ese total, las $\frac{3}{4}$ partes de los afectados pertenecen a los países subdesarrollados, donde únicamente se utiliza el 25% de la producción mundial de plaguicidas [3].

Las intoxicaciones mortales son de poca incidencia en España, pero de gran repercusión en Portugal. Según la casuística de la delegación de Coimbra del INML, dicha institución es requerida para efectuar anualmente una media de 247 *screenings* toxicológicos en los que están involucrados estos pesticidas. Esta considerable demanda justifica la puesta a punto de métodos analíticos que puedan ser incorporados a la rutina del laboratorio, como el propuesto en este trabajo.

Las muestras biológicas empleadas fueron sangre total y orina. La elección de la sangre como matriz de estudio resulta obvia, puesto que es la única muestra que permite correlacionar los niveles determinados con la sintomatología observada

y eventualmente con la muerte del individuo. Se estudió también la orina, ya que estos compuestos son eliminados por vía urinaria, tanto en forma de metabolitos como de forma inalterada.

No se contempló el estudio en contenido gástrico, pese a ser una muestra importante cuando la vía de entrada del tóxico es la vía oral, ya que se trata de una matriz altamente compleja tanto por su composición como por su manejo a la hora de efectuar la validación.

Finalmente, los pesticidas incluidos en el estudio han sido aquellos más frecuentemente involucrados en intoxicaciones humanas, tal y como ya se ha mencionado en otras partes de esta memoria. No se han estudiado los productos del metabolismo, que además de inespecíficos son altamente inestables.

LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA COMO TÉCNICA ANALÍTICA

En los análisis forenses, el procesamiento de las muestras envuelve normalmente la extracción y concentración de los analitos pretendidos a través de varias técnicas, como por ejemplo la extracción líquido-líquido o sólido-líquido. Como ya comentamos anteriormente, estos métodos poseen varios inconvenientes, incluyendo el excesivo tiempo de preparación y el uso de solventes orgánicos [4-6].

Nuestro objetivo, al iniciar este trabajo, fue el desarrollo de una técnica rápida y sensible, capaz de detectar y cuantificar pesticidas organofosforados en muestras biológicas. Por todo ello, escogimos la microextracción en fase sólida (SPME), y más concretamente la modalidad de inmersión directa, ya que cuando se utiliza la HS-SPME, la mayor parte de los pesticidas no volátiles son excluidos de la determinación [7].

Esta técnica de adsorción/desorción, además de no necesitar solventes orgánicos, está dotada de una gran selectividad, por lo que los extractos obtenidos son en general más limpios que con la extracción líquido-líquido.

Otra ventaja que presenta frente a otras técnicas de extracción, es que toda la cantidad de analito extraída es inyectada en el sistema cromatográfico, con lo que se logran alcanzar bajos límites de detección y cuantificación.

En nuestro caso concreto, no sólo se utilizó para efectuar la cuantificación de las muestras, sino que en algunas ocasiones se utilizó como técnica de *screening*.

Como la SPME es una técnica basada en el equilibrio de partición del analito entre la muestra y la cubierta de la fibra, fue necesario optimizar todo el proceso de extracción para que el rendimiento fuese máximo. De este modo, parámetros como tipo de fibra, volumen de muestra, precipitación de proteínas, tiempos de extracción y desorción, temperatura, agitación, modificación del pH y fuerza iónica, fueron previamente optimizados. De todos éstos, algunos nos merecen especial consideración:

a) Volumen de muestra biológica

El volumen de muestra empleado en este trabajo fue de 100 μL . La utilización de un volumen pequeño de muestra es importante, ya que muchas veces la cantidad de muestras disponibles para efectuar los análisis es reducida.

b) Tiempo de extracción

Verificamos que el equilibrio de extracción no se alcanzaba para ninguno de los pesticidas estudiados, incluso transcurridas 3 horas de inmersión, por lo que fue necesario elegir una solución de compromiso que abarcaba, por una parte, cantidad extraída, y por otra, tiempo de extracción. El tiempo de elección fue 60

minutos, el cual nos permitió obtener una buena sensibilidad para todos los compuestos en ambas matrices. No obstante, hemos comprobado que el método era reproducible en un intervalo de extracción entre 40 y 80 minutos, sin perder precisión en la determinación. Esto es importante en aquellos casos en donde no se requiera un control exhaustivo del tiempo.

c) Temperatura de extracción

El aumento de la temperatura durante la extracción tiene un efecto negativo sobre el rendimiento, ya que la constante de distribución entre la muestra y la fibra disminuye. Sin embargo en situaciones donde no se alcanza el equilibrio, es posible obtener mayor sensibilidad con el aumento de este parámetro [8]. En nuestro caso, se ha observado un aumento significativo de la cantidad de analito extraída a medida que se aumentaba la temperatura. Como ya hemos comentado, es posible que este aumento se deba a que el tiempo escogido para la extracción no corresponde al tiempo de equilibrio. Así, el hecho de calentar las muestras durante la extracción permitió obtener límites analíticos más bajos.

En el caso de las muestras de sangre, la temperatura escogida fue de 60 °C, ya que temperaturas superiores producen una coagulación de la sangre, lo que hace dificultosa y compleja la extracción. Todos los pesticidas estudiados bajo estas condiciones tuvieron un buen comportamiento, obteniéndose reproducibilidad en los resultados.

Por otro lado, en el caso de las muestras de orina, la temperatura escogida fue más elevada, ya que las características de esta muestra lo permiten siempre y cuando no se produzca una evaporación de la misma. De ese modo, se eligió la temperatura de 90 °C, aunque a la misma no hemos obtenido una buena reproducibilidad a la hora de aplicar el método a la determinación de dimetoato,

por lo que la determinación de este pesticida en orina fue efectuada a temperatura ambiente.

d) Agitación de las muestras

En teoría, una buena agitación facilita el reparto del analito entre la muestra y la cubierta de la fibra. Sin embargo, con relación a este parámetro, no se obtuvieron mejorías significativas en el rendimiento si se compara con no agitarlas. La eficiencia en el proceso de agitación condiciona los resultados, de manera que si la agitación no es eficiente, éstos podrán ser incluso peores que sin agitación [8, 9]. De esta forma, nuestros resultados pueden explicarse por el hecho de no haber realizado una eficiente agitación, ya que trabajamos con tubos de volumen reducido, en los cuales existen serias dificultades para agitarlos.

También es necesario tener en cuenta que la agitación de la muestra puede llevar a efectos de *carry-over* (debido a la utilización del mismo agitador), y por lo tanto debemos de ser muy exigentes en la limpieza del agitador [8].

e) Modificación de pH y adición de sales

Para el estudio del pH, trabajamos con tampón fosfato 1/15 M con un rango entre 5 a 8, ya que era más adecuado a la fibra de CW/DVB, que fue la con que obtuvimos los mejores resultados. De hecho, pHs inferiores a 2 o superiores a 9 dañan irreversiblemente la cubierta de la fibra, disminuyendo su vida media. La variación de pH no mejoró significativamente el rendimiento de extracción, e incluso originó peores resultados en orina. Esto probablemente se deba a un efecto negativo del aumento de la fuerza iónica de la muestra por acción de los iones fosfato del tampón. Este fenómeno se confirmó con la adición de NaCl a las muestras.

f) Limpieza de la fibra

Como la sangre es una matriz extremadamente compleja debido a su composición (proteínas, ácidos grasos y colesterol), optamos por limpiar la fibra con el fin de prolongar la vida de ésta después de cada extracción y antes de la desorción. Así, la fibra era sumergida en agua durante 5 segundos, y durante este periodo de lavado, era perfectamente visible como la suciedad se desprendía de la fibra. Aplicando este procedimiento fue posible efectuar entre 70 y 90 extracciones reproducibles con una misma fibra en el caso de las muestras de sangre para todos los pesticidas, excepto en el caso del dimetoato, que, por alguna razón que ignoramos, sólo fue posible realizarlo de 20 a 25 ocasiones (a partir de este número, la cantidad de patrón interno extraída era aproximadamente la mitad, mientras que las áreas del dimetoato eran más o menos constantes). Cuando la matriz empleada era orina, se consiguieron realizar más de 120 extracciones reproducibles para los tres pesticidas.

CONSIDERACIONES ACERCA DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA EMPLEADA

El método cromatográfico utilizado nos permitió separar todos los pesticidas, a excepción del paratión-clorpirifos y quinalfos-clorfenvinfos, ya que tienen el mismo tiempo de retención. Sin embargo, como estos compuestos poseen iones de cuantificación diferentes, en el caso de aplicar el método en modalidad de *Selective Ion Monitoring* (SIM), estos pueden separarse perfectamente.

La elección de patrón interno (PI) está directamente relacionada con los aspectos cromatográficos y con la aplicación del método cuantitativo. Como norma general, el PI ideal es aquella sustancia que posee una elevada semejanza estructural con los analitos objeto de análisis, ya que de este modo todos los procesos que pueda sufrir la muestra hasta su análisis ocurrirán en la misma

extensión tanto para los analitos como para el PI (dilución, extracción, etc.). Inicialmente, se pensó en la utilización de PI deuterados, pero se comprobó que en el mercado existían únicamente dietil diazinón-d₁₀ y dietil clorpirifos-d₁₀. La dificultad de conseguirlos motivó la utilización del etión, pesticida organofosforado no comercializado en Portugal y España. Además, demostró tener un buen comportamiento durante la extracción y el análisis cromatográfico.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS ANALÍTICOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO

El estudio de los resultados analíticos presentados en el capítulo 6 fue realizado según criterios internacionalmente aceptados para la validación de métodos bioanalíticos [10-12]. Siguiendo estos criterios podemos afirmar que los métodos presentados en esta memoria tienen la fiabilidad y precisión adecuadas para su aplicación en el ámbito de la toxicología clínica y forense.

Los parámetros de validación recomendados fueron aplicados para los principales pesticidas, quinalfos, paratión y dimetoato, que como ya se ha comentado se encuentran asociados a intoxicaciones de ámbito médico-legal en Portugal. Para el resto de los pesticidas de estudio únicamente se evaluaron parámetros de selectividad y límites de detección.

Hay que tener en cuenta que, al trabajar con muestras biológicas complejas como la sangre, es probable que durante los procesos de extracción, se puedan coextraer otras sustancias además de las moléculas de interés, y que pueden interferir analíticamente en nuestro método. En este sentido, la metodología utilizada demostró ser sensible y selectiva, ya que en ningún caso obtuvimos interferencias entre los pesticidas de estudio y otras moléculas.

En términos de sensibilidad, los resultados analíticos para el dimetoato, paratión y quinalfos nos permitieron obtener resultados similares o mejores que los descritos en artículos publicados sobre el uso de la SPME, en los que el volumen

de muestra empleado era superior al nuestro [13-15] (LOD: 10-200 ng/mL en sangre y 2-50 ng/mL en orina). Lo mismo sucede a la hora de comparar la recuperación absoluta, en la que obtuvimos valores más elevados que los descritos en la literatura científica [13-15]. No fue posible comparar los límites obtenidos para las muestras de orina, ya que la determinación de este tipo de compuestos en esta matriz no se encuentra documentada en la literatura científica consultada. En el caso del dimetoato, nuestros resultados tampoco fueron comparables con los de otros autores, ya que no existen trabajos publicados donde se determine este analito en muestras biológicas por SPME.

En cuanto a los restantes parámetros de validación, ambos métodos se revelaron lineales dentro de los rangos de concentración estudiados, a pesar de que en todos los casos fue necesario establecer dos intervalos de linealidad. Los parámetros obtenidos para la precisión y exactitud para los diferentes niveles de calibración fueron considerados adecuados, ya que se encontraban dentro de los límites considerados aceptables por las normas internacionales ya comentadas. Destacamos el hecho de que las rectas de calibrado se mantuvieron estables entre 2 y 10 meses, que fue la duración del estudio de la precisión y exactitud interdía. Respecto a los ensayos de dilución, la dilución 1/10 (tanto en el caso de sangre como de orina) proporcionó resultados analíticos fiables, lo que permite el análisis de muestras con un volumen de 10 a 100 μL sin perder precisión ni exactitud en el análisis. Esto fue útil en el caso de muestras que presenten valores superiores al punto de calibración más alto, de forma que éstas pueden ser diluidas y reanalizadas posteriormente.

En cuanto a los ensayos de estabilidad, cabe destacar que fueron estudiadas la estabilidad de las soluciones estándar, de los analitos en muestras procesadas, de los analitos tras periodos cortos a la temperatura de trabajo en el laboratorio y a ciclos de congelación-descongelación. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios de acuerdo con los criterios establecidos [16].

Estos resultados no se pudieron comparar ya que los trabajos publicados sobre pesticidas no mencionan este parámetro de validación.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA APLICACIÓN DEL MÉTODO A CASOS REALES.

Una vez completada la validación de los métodos analíticos, éstos fueron incorporados a la rutina del laboratorio. Las metodologías fueron aplicadas a 99 muestras reales de diferente procedencia que llegaron al Servicio de Toxicología Forense de la Delegación de Coimbra del INML. La mayoría de las muestras analizadas fueron de sangre, ya que el envío de muestras de orina no es frecuente. La mayor parte de los casos procedió de autopsias médico-legales.

Las concentraciones obtenidas fueron variables, oscilando entre 0,37 - 487,22 µg/mL para el dimetoato, 0,08 - >500 µg/mL para el quinalfos y de 0,05 - >500 µg/mL para el paratión. Destacamos que en algunas muestras la concentración de pesticida determinada era superior al límite superior de cuantificación. En tres de estos casos, incluso realizando la dilución de la muestra 1/10 (10 µL de muestra a los cuales fueron añadidos 90 µL de sangre blanca), no se logró calcular por interpolación la concentración de pesticida. En todo caso, dichos niveles tan variables confirman la amplia versatilidad del método analítico, que alcanza límites de cuantificación muy bajos, a la vez que permite determinar concentraciones elavadas.

El quinalfos fue el POF más frecuentemente detectado en los casos analizados. Únicamente en uno de los casos realizados se detectó la presencia de dos pesticidas en la misma muestra (caso nº 5). No pudo ser analizado el otro caso de asociación quinalfos-paratión (mencionado en el capítulo 1, apartado 11), ya que era una muestra hospitalaria y estas muestras son destruidas una vez efectuados

los análisis toxicológicos. En ninguno de los casos positivos a paratión se detectó la presencia de su metabolito paraoxón.

Es necesario destacar que en 3 casos (nº 14, 22 y 73), no fue detectada la presencia de pesticida en sangre, sin embargo el análisis efectuado por extracción líquido-líquido (utilizado en la rutina del laboratorio) demostró la presencia de estos en contenido gástrico.

REFLEXIÓN FINAL

No queremos finalizar la discusión sin realizar una reflexión sobre algunos aspectos que van un poco más allá de lo que constituye el trabajo científico propiamente dicho.

Consideramos que una de las principales virtudes de este procedimiento que hemos planteado, a priori muy laborioso, es que contribuye a minimizar el uso de reactivos, en comparación con los métodos tradicionales, que generan un importante volumen de desechos, altamente contaminantes.

La Toxicología Analítica no puede quedar al margen de la preocupación y concienciación generalizada que existe en nuestra sociedad sobre el respeto al medio ambiente, y en este sentido debe encaminar sus esfuerzos a conseguir resultados fiables con métodos limpios y sostenibles, como el propuesto en esta memoria.

Por tanto consideramos que esta técnica debería ser paulatinamente implementada en los análisis de rutina de los Laboratorios de Toxicología para todas aquellas sustancias cuyas concentraciones puedan ser detectadas con su aplicación, teniendo en cuenta, por supuesto, las limitaciones relativas a su sensibilidad. Aunque la optimización del método pueda resultar tediosa y engorrosa, el esfuerzo inicial será recompensado por el trabajo bien hecho.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Ferrer Dufol A, Martínez Chuecos J. Insecticidas. In: Marruecos L, Nogué S, Nolla J, editors. Toxicología Clínica. Barcelona: Springer-Verlag Ibérica, S.A.; 1993, p. 233-241.
- [2] Ecobichon DJ. Efectos tóxicos de los pesticidas. In: Klaasen CD, Watkins JB, editors. Casarett y Doull. Fundamentos de toxicología (Edición Española revisada por López-Rivadulla M). Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2003, 339-353.
- [3] World Health Organization. Directrices sobre la gestión de los plaguicidas para la salud pública. [documento online] 2003 [consultado 2004 Dic 11]. Disponible en: URL: http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_WHOPES_2003.7_spa.pdf.
- [4] Supelco. SPME/GC for forensic applications: Explosives, fire debris, and drugs of abuse. Bulletin 922. [documento online] 1998 [consultado em 2001 Oct 16]. Disponible en: URL: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4546.pdf>.
- [5] Supelco. Solid phase microextraction/capillary GC analysis of drugs, alcohols, and organic solvents in biological fluids. Bulletin 901A. [documento online] 1999 [consultado em 2001 Oct 15]. Disponible en: URL: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4533.pdf>
- [6] Supelco. Solid phase microextraction of volatile compounds. Application Note 11. [documento online] 1998 [consultado em 2001 Jul 23]. Disponible em: URL: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4558.pdf>.
- [7] López FJ, Pitarch E, Egea S, Beltrán J, Hernández F. Gas chromatographic determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in human fluids using solid phase microextraction. Anal Chim Acta 2001; 433: 217-226.
- [8] Ulrich S. SPME in biomedical analysis. J Chromatogr A 2000; 902: 167-194.

- [9] Pawliszyn J. Solid phase microextraction: Theory and practice. New York: Wiley-VCH; 1997.
- [10] Food and Drug Administration: U.S. Department of Health and Human Services. Guidance for industry, bioanalytical method validation. [documento online] 2001 [consultado 2003 En 10]. Disponible en: URL: <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fml.pdf>.
- [11] International Conference on Harmonization (ICH). Validation of analytical methods: Methodology ICH Q2 B. [documento online] 1996 [consultado 2003 En 10]. Disponible en: URL: http://www.ich.org/MediaServer.jserv?@_ID=4188@_MODE=GLB.
- [12] Peters FT, Maurer HH. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - a review. *Accredit Qual Assur* 2002; 7: 441-449.
- [13] Musshoff F, Junker H, Madea B. Rapid analysis of paration in biological samples using headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 639-642.
- [14] Musshoff F, Junker H, Madea B. Simple determination of 22 organophosphorous pesticides in human blood using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J Chromatogr Sci* 2002; 40: 29-34.
- [15] Tsoukali H, Theodoridis G, Raikos N, Grigoratou I. Solid phase micrfoextraction gas chromatographic analysis of organophosphorus pesticides in biological samples. *J Chromatogr B* 2005; 822: 194-200.
- [16] Dadgar D, Vurnett PE. Issues in evaluation of bioanalytical method selectivity and drug stability. *J Pharm Biomed Anal* 1995; 14: 23-31.

Todas las referencias bibliográficas fueron elaboradas siguiendo las normas establecidas por la United States National Library of Medicine: Bibliographic Services Division, International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Group). Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: sample references [documento online] [consultado en 2003 Sep 22] Disponible en: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

1. Se propone un método analítico basado en la Microextracción en Fase Sólida acoplada a la Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas para la determinación de ocho pesticidas organofosforados en muestras de sangre total y orina.
2. El método propuesto demostró ser selectivo, lineal, preciso y exacto, de acuerdo con parámetros de validación regulados por organizaciones internacionales.
3. La sensibilidad del método fue adecuada para detectar las concentraciones que normalmente aparecen en las muestras reales procedentes de intoxicaciones ocasionadas por este tipo de sustancias, a pesar de utilizar únicamente 100 μ L de muestra.
4. Se han optimizado los principales parámetros que influyen en el proceso de microextracción, encontrándose que la aplicación de esta técnica con inmersión directa, a temperatura elevada, sin modificación de pH ni de la fuerza iónica, ha contribuido a incrementar la sensibilidad de la técnica, permitiendo además alargar considerablemente la vida útil de la fibra.
5. Por todo lo anteriormente mencionado, la metodología descrita constituye una alternativa a los métodos de extracción convencionales, como la extracción líquido-líquido o sólido-líquido, para la determinación de pesticidas organofosforados en medios biológicos en el ámbito de la Toxicología Clínica y Forense.

ANEXOS

Application of solid phase microextraction to the determination of strychnine in blood

M. Barroso^{a,*}, E. Gallardo^b, C. Margalho^a, S. Ávila^a, E.P. Marques^a,
D.N. Vieira^a, M. López-Rivadulla^b

^a Instituto Nacional de Medicina Legal, Delegação de Coimbra, Largo da St. Nova, 3000-213 Coimbra, Portugal

^b Instituto de Medicina Legal, San Francisco s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Received 19 January 2004; accepted 29 October 2004

Available online 24 November 2004

Abstract

A simple and rapid method based on solid phase microextraction (SPME) via direct immersion followed by gas chromatography coupled with electron impact ionization/mass spectrometry (GC/EI-MS) was developed for the determination of strychnine in blood. Papaverine was used as internal standard (I.S.). Two types of fibre coating were tested, 100 μm polydimethylsiloxane and 65 μm CarbowaxTM/Divinylbenzene, the latter giving higher recoveries of the compound. The main factors affecting the SPME process, such as sample dilution (1:10), adsorption and desorption times (20 and 10 min, respectively), carry-over effect (not observed), pH and salt addition (no modifications on pH or salt concentration) were optimized. The procedure was validated in terms of linearity ($r^2 = 0.9992$ for concentrations ranging from 0.10 to 5.00 $\mu\text{g/mL}$), intra and interday precision (0.93 and 4.62%, respectively at 0.50 $\mu\text{g/mL}$; 3.33 and 8.06%, respectively at 2.50 $\mu\text{g/mL}$), sensitivity (6.83 and 8.91 ng/mL for LOD and LOQ, respectively) and extraction recovery (0.54 and 0.39% at 0.50 and 2.50 $\mu\text{g/mL}$, respectively). The developed procedure was found suitable for forensic investigations and was considered a good alternative to the liquid–liquid extraction methods normally used for the determination of this compound in biological media.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Solid-phase microextraction; Strychnine

1. Introduction

Strychnine is an alkaloid which was first isolated from St. Ignatius beans (*Strychnos ignatii*) in 1818. However, its commercial source is the ripe dried seed of *Strychnos nuxvomica*, a tree native in India [1]. This compound acts in the central nervous system [2], by selectively blocking the post synaptic inhibitory activity of glycine [3]. Strychnine is rapidly absorbed from the gastrointestinal tract. There is very little protein binding [4], and its distribution to tissues is rapid. The major route for removal and detoxification is hepatic metabolism [5], via enzymatic degradation involving the liver microsomal system, and up to 20% of the drug can be

excreted unchanged in the urine [4]. Soon after ingestion, violent and generalized convulsions take place, and when death occurs, it is commonly due to asphyxia from respiratory arrest during convulsions [6]. Serum levels of 0.075–0.1 $\mu\text{g/mL}$ are reported to produce toxic effects, whereas concentrations of 0.2–2 $\mu\text{g/mL}$ have been associated to fatalities [7].

Several methods are described for the determination of strychnine, using paper chromatography after dissolution of the alkaloidal extract from *Nux-vomica* seed in chloroform [8], or liquid–liquid extraction followed by either thin-layer chromatography [9], high performance thin-layer chromatography [10], gas chromatography [2,6,11–15] or liquid chromatography [16–20].

Solid phase microextraction (SPME) was developed by Arthur and Pawliszyn in the early 1990 at the University of Waterloo (Ont., Canada) [21]. This technique displays

* Corresponding author. Fax: +351 239 820549.

E-mail address: mjbarroso@iol.pt (M. Barroso).

some advantages when compared to other sample preparation methods, since it does not require the use of organic solvents, the handling of samples is easy and fast, and the equipment necessary to accomplish the analysis is simple [22]. This methodology has been used for the determination of several substances, such as pesticides [23–29], drugs of abuse [30–33], or medical substances [34,35], but its application to the determination of strychnine is not reported in the literature.

This paper describes a new method based on direct immersion SPME with gas chromatography/electron impact ionization mass spectrometry (GC/EI-MS) for the determination of strychnine in whole blood samples.

2. Experimental

2.1. Reagents and equipment

Analytical standards, crystallized strychnine and papaverine hydrochloride, were obtained from Merck Co. (Darmstadt, Germany) and Almirall laboratories (Barcelona, Spain), respectively.

Methanol (HPLC grade), phosphoric acid, sodium hydrogrophosphate and sodium chloride (analytical grade) were obtained from Merck Co.

Methanolic standard stock solutions at 1000 µg/mL were prepared and stored at 4 °C. Subsequently working solutions at 100 and 10 µg/mL for strychnine and at 10 µg/mL for papaverine [internal standard (I.S.)] were prepared in methanol.

Phosphate buffer solutions were prepared by mixing solutions of phosphoric acid and sodium hydrogenphosphate, in variable proportions, according to the desired pH [36].

The biological sample used was fresh human blood, obtained from the exceeding of the Portuguese Institute of Blood, preserved with citrate phosphate dextrose (1:7).

The SPME fibre holder for manual use, 100 µm polydimethylsiloxane (PDMS) and 65 µm Carbowax™/Divinylbenzene (CW/DVB) coated fibres were obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA).

Chromatographic analysis was performed using a 6890 Series gas chromatograph (Hewlett-Packard, Wilmington, DE, USA), equipped with a model 5973 mass selective detector (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA). A capillary column (12 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness) packed with 5% phenylmethylsiloxane (Ultra 2), supplied by J&W Scientific (Folsom, CA, USA), was used. The carrier gas was helium at a constant flow rate of 1 mL/min.

The GC oven temperature program started at 150 °C for 1 min, then raised by 35 °C/min to 200 °C, held for 1 min and finally elevated by 40 °C/min to 270 °C, where it was kept constant for 7 min. The injector port (splitless) and the detector temperatures were set to 240 and 280 °C, respectively. The mass spectrometer was operated with a filament current of 300 µA and an electron energy of 70 eV in the electron impact (EI) mode. Quantification was done in the selected

ion monitoring (SIM) mode, and the monitored ions were 338, 324 and 308 for papaverine, and 334, 120 and 162 for strychnine.

The retention times were 7.69 and 10.73 min for papaverine and strychnine respectively, obtaining a good separation of both compounds.

2.2. Extraction procedure

New fibres were conditioned in the injector of the GC system as follows: PDMS fibres were heated at 250 °C for 30 min and CW/DVB at 220 °C for 30 min, according to the suppliers' specifications.

The parameters that could influence the extraction of strychnine, such as adsorption and desorption times, pH, ionic strength and agitation during the adsorption process were optimized preliminarily, as described in Section 3.1, and the final conditions were as follows.

After addition of 250 ng of papaverine (I.S.) to 100 µL of blood, a final volume of 1 mL was obtained with water. The sample was then agitated for 30 s, and a 65 µm CW/DVB coated fibre was directly immersed in it for 20 min. After extraction the fibre was thermally desorpted in the injection port of the GC system for a total period of 10 min (5 min before the run was started and for another 5 min after the run was started).

2.3. Validation procedure

The procedure was validated in terms of selectivity, linearity, precision, accuracy, sensitivity and absolute recovery. Selectivity was evaluated by analyzing a set of ten blank samples, and it was checked for interferences at the retention times and monitored ions. Calibration data were generated using spiked blood samples, and the calibration curve was established between 0.10 and 5.00 µg/mL. Precision was characterized in terms of relative standard deviation (R.S.D.%) by analyzing sets of six spiked blood samples at both low and high concentrations in the same day (intraday precision) and on 4 different days (interday precision). Accuracy was evaluated in terms of percentage error (RE%) between the measured and the spiked concentrations for all calibrators, and also for the intra and interday precision assays; the limits of acceptable variability were set at 15% for all concentrations. The limits of detection and quantification (LOD and LOQ, respectively) were determined using blank samples. LOD was defined as the mean calculated analyte concentration in 10 blank samples (the background noise was interpolated in the calibration curve) plus three times the standard deviation, and LOQ was defined as the mean value plus 10 times the standard deviation.

Absolute recovery was calculated at both low and high concentrations by comparing peak areas of spiked samples with those obtained from splitless injections of methanolic solutions of strychnine.

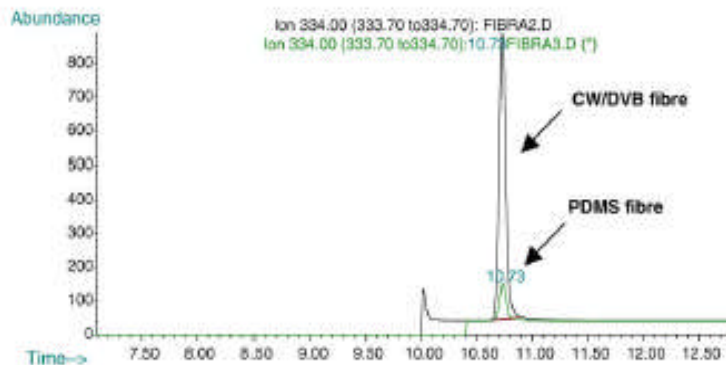


Fig. 1. Merged chromatograms (ion 334) obtained with both coated fibres in the extraction of strychnine at $1 \mu\text{g/mL}$.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of SPME

In the present work, sample dilution, adsorption and desorption times, pH, ionic strength and sample agitation during adsorption were optimized ($n = 3$).

Two types of fibre coating were tested: the $100 \mu\text{m}$ PDMS and the $65 \mu\text{m}$ CW/DVB. PDMS fibre was excluded because of very low recovery, when compared with CW/DVB (Fig. 1).

3.1.1. Dilution of the sample

In order to study the influence of matrix constituents on the extraction yield, blood was diluted with water prior to the extraction. Dilution factors of 2, 5 and 10 were tested (500, 200 and $100 \mu\text{L}$ of blood were spiked with $1 \mu\text{g}$ of strychnine, and a final volume of 1 mL was achieved by addition of water).

The best extraction yield was obtained using a sample volume of $100 \mu\text{L}$, e.g., applying to the sample a dilution factor of 10. This dilution factor also originated better resolved chromatograms, and therefore a sample volume of $100 \mu\text{L}$ was chosen to carry out this work.

3.1.2. Adsorption and desorption times

Solid phase microextraction is an equilibrium process that involves partitioning of analytes between two phases: an aqueous or gaseous phase (the sample) and a solid phase (the fibre coating). Therefore, the optimization of the contact time between these two phases is crucial. The influence of the adsorption time on the extraction yield was evaluated using aqueous solutions of strychnine at $1 \mu\text{g/mL}$. To find the best adsorption time, the fibre was directly immersed in the sample for 1, 5, 10, 15, 20, 30 and 45 min, and peak areas obtained for each extraction time were compared. Equilibrium was reached after 20 min of contact. Longer adsorption times did not significantly improve the extraction yield, and therefore the selected time for adsorption was 20 min.

The optimization of desorption time aims at achieving the complete desorption of the adsorbed analyte, to improve sensitivity, and simultaneously avoid carry-over effects.

After extraction, the fibre was desorbed in the injection port of the GC for 1, 2, 3, 5 and 6 min before the run was started. On the basis of peak areas evaluation the best desorption time was 5 min. To test for carry-over effects, further desorption times were tested. After 5 min of desorption, the run was started, and the fibre was left in the injector for additional time before it was retracted (1, 3, 5 and 6 min). The largest peak areas were obtained for a total desorption time of 10 min (5 min before and 5 min after the run was started). Carry-over effects were not observed after adopting this procedure, even at concentrations twice superior to the highest calibrator of the calibration curve.

3.1.3. pH and ionic strength

To enhance the extraction of organic analytes from aqueous matrices it is common to use pH adjustment and salting. The pH of the sample has an important role in SPME, and a basic pH is expected to improve the extraction of a basic analyte [37]. The effect of pH on the extraction yield was evaluated by diluting spiked blood samples at $1 \mu\text{g/mL}$ in phosphate buffer 0.07 M (pH 5–8) instead of water. The peak areas obtained for each of the pH values were compared. The largest amount of strychnine was extracted at pH 8, as it would be expected, since strychnine is a basic analyte. However, the dilution of the sample with water yielded larger recovery of the compound, which may have been due to a possible effect of an increase in salt concentration derived from the phosphate buffer. In fact, if the analyte is in dissociated form, a decrease in the amount extracted may be observed when the salt concentration is increased, since the activity coefficient of the ionic species in the aqueous matrix increases with the increase of the sample's ionic strength [37]. In the case of strychnine, the compound would be mainly in dissociated form, since its pK_a values are 2.3 and 8.0 [38], being negatively affected by the increase in salt concentration. It was not possible to convert strychnine into its neutral form

because, as the maximum pH value allowed for this type of coated fibre is 9, higher pH values could not be tested, since the lifetime of the fibre would be dramatically decreased. Therefore, this study was carried out diluting the sample with water.

The effect of ionic strength on extraction efficiency was evaluated by analyzing the amount of strychnine extracted in sample solutions containing 0, 0.375, 0.75, 1.5 and 3% of sodium chloride. The extracted amount decayed with the increase of salt concentration in the sample, which corroborates the results obtained in the pH experiments.

3.1.4. Sample agitation during the adsorption process

To evaluate the influence of agitation on the extracted amount of strychnine, spiked blood samples at 1 µg/mL were analyzed with, and without agitation during the adsorption process, and both peak areas were compared. Sample agitation did not improve significantly the extraction yield.

3.2. Validation of the analytical method

Spiked blood samples were analyzed by direct immersion of the 65 µm CW/DVB coated fibre for 20 min without agitation. After this period of time, the fibre was retracted and desorbed in the injector of the GC during 5 min before the run was started and for further 5 min after the run was started.

3.2.1. Selectivity

Selectivity, as the ability of the method to distinguish between the analyte and matrix constituents, was checked analysing blank samples ($n = 10$). No interferences by matrix constituents at the retention times and selected ions of strychnine and papaverine were observed (Fig. 2).

3.2.2. Calibration curve and linearity

The calibration curve (peak area ratio between analyte and I.S. versus analyte concentration) was established in spiked

Table 1

Validation data of the calibration curve

Concentration	R.S.D. (%)	Regression line	r^2	RE (%)
0.10	7.43	$y = 0.3976x - 0.0018$	0.9992	10.44
0.25	7.22			-12.97
0.50	4.60			-2.93
1.00	6.65			-2.21
1.50	7.36			-2.43
2.50	8.80			3.80
4.00	7.07			-1.93
5.00	8.31			0.13

Concentrations expressed in µg/mL ($n = 6$); R.S.D.: relative standard deviation; RE: relative error.

blood samples, prepared and analyzed using the above mentioned procedure, between 0.10 and 5.00 µg/mL. The correlation coefficient of the calibration curve was 0.9992. The data related to the calibration curve and linearity are listed in Table 1.

3.2.3. Limits of detection and quantification

Theoretical limits of detection and quantification (LOD and LOQ, respectively) were determined using blank samples ($n = 10$), as described in Section 2.3.

The obtained values were 6.83 and 8.91 ng/mL for LOD and LOQ, respectively.

3.2.4. Intra- and interday precision

To evaluate the intraday precision a set of six spiked blood samples at both low and high concentrations (0.50 and 2.50 µg/mL) was analyzed in the same day using the above mentioned procedure. The samples were quantified and the coefficient of variation (CV) was calculated. The CVs were 0.93 and 3.33% at 0.50 and 2.50 µg/mL, respectively.

Interday precision was calculated by analyzing sets of six spiked blood samples at 0.50 and 2.50 µg/mL on 4 consecutive days. The procedure was the same used above. The calculated CVs were 4.62 and 8.06% for 0.50 and 2.50 µg/mL, respectively.

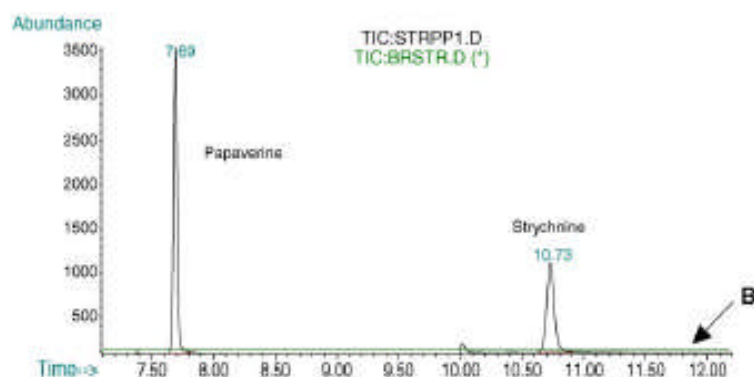


Fig. 2. Merged chromatograms obtained from a spiked blood sample at 1 µg/mL of strychnine and from a blank blood sample (B).

Table 2
Validation data

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Intraday precision ($n=6$)				Interday precision ($n=6$)				Recovery (%)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
	Spiked	Found	CV	RE	Spiked	Found	CV	RE			
0.50	0.50	0.48	0.93	-3.34	0.50	0.47	4.62	-5.11	0.54	6.83	8.91
2.50	2.50	2.38	3.33	-4.80	2.50	2.49	8.06	-0.40	0.39		

CV: coefficient of variation (%); RE: relative error (%).

Table 3
Results obtained by applying the proposed method to three authentic samples

	Strychnine ($\mu\text{g/mL}$)
Case 1	2.39
Case 2	1.27
Case 3	1.03

3.2.5. Absolute recovery

To calculate the absolute recovery of the described method, sets of six spiked samples at 0.50 and 2.50 $\mu\text{g/mL}$ were analyzed, and peak areas were compared with those obtained from a splitless injection of 1 μL of methanolic solutions of strychnine at 10 and 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$, respectively. Because strychnine amount in the methanolic solutions was 50 times lower than the theoretically extracted by the fibre (if analyte recovery was 100%), it was necessary to apply a factor of 50 to peak areas obtained with the methanolic solutions.

Absolute recovery was calculated for both concentrations according to the formula:

$$\text{Absolute recovery} = \frac{\text{SPME peak area}}{\text{Methanolic solution peak area} \times 50} \times 100$$

The calculated values were 0.54 and 0.39% at the concentrations of 0.50 and 2.50 $\mu\text{g/mL}$, respectively. These recovery values are low when compared with other described in the literature for the determination of strychnine in blood [2,10]. However, this finding is quite normal, since recoveries reported for SPME are in general considerably lower than those observed for liquid–liquid extractions [19].

Table 2 resumes, LOD, LOQ, precision and accuracy, and absolute recovery at both low and high concentrations.

3.2.6. Application to authentic samples

After being optimized and validated, the described method was then applied to three real blood samples belonging to persons intoxicated with strychnine, which were obtained from the Laboratories of Forensic Toxicology from the Delegations of Coimbra and Lisbon of the National Institute of Legal Medicine in Portugal (Table 3).

4. Conclusions

Direct immersion SPME coupled with GC/MS-EI has proved to be a fast, simple, solvent-free method for the determination of strychnine in blood samples. Since the method-

ology is selective, linear within the studied range, precise, accurate and sensitive, we may conclude that it can be successfully applied to forensic cases, in spite of the low extraction recovery presented. Also, its fastness when compared to other techniques, and the fact that no organic solvents are required to accomplish the analysis, make this method a good alternative to the conventional extraction procedures normally used for the determination of this compound in biological media.

References

- [1] J.A. Perper, *J. Forens. Sci.* 30 (1985) 1248.
- [2] E.P. Marques, F. Gil, P. Proença, P. Monsanto, M.F. Oliveira, A. Castanheira, D.N. Vieira, *Forens. Sci. Int.* 110 (2000) 145.
- [3] W. Yumrick, P. Watson, J. DiTraglia, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 30 (1992) 141.
- [4] J.M. Heiser, M.R. Daya, A.R. Magnussen, R.L. Norton, D.A. Spyker, D.W. Allen, W. Krasselt, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 30 (1992) 269.
- [5] R. Boyd, P.T. Brennan, J.F. Deng, D.F. Rochester, D.A. Spyker, *Am. J. Med.* 74 (1983) 507.
- [6] C.L. Wink, W.W. Wahba, F.M. Esposito, W.D. Colom, *J. Anal. Toxicol.* 10 (1986) 120.
- [7] D. Uges, Therapeutic and toxic drug concentrations list, TIAFT [document online] [cited 17 May 2004], available from URL: <http://www.tiaft.org/Amembers/tv/ps.html>.
- [8] A.M. Metwally, *Pharmazie* 33 (1978) 763.
- [9] G.P. Sgaragli, P.F. Mammaioni, *Clin. Toxicol.* 6 (1973) 533.
- [10] P. De Saqui-Sannes, P. Nups, P. Le Bars, V. Burgat, *J. Anal. Toxicol.* 20 (1996) 185.
- [11] N. Platnow, H.S. Funnell, W.T. Oliver, *J. Forens. Sci.* 15 (1970) 443.
- [12] G. Miller, J. Warren, K. Gobre, L. Hanks, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 65 (1982) 901.
- [13] T.G. Rosano, J.D. Hubbard, J.M. Meek, T.A. Swift, *J. Anal. Toxicol.* 24 (2000) 642.
- [14] M. Cingolani, R. Froldi, R. Mencarelli, D. Rodriguez, *J. Anal. Toxicol.* 23 (1999) 219.
- [15] R. Greene, R. Metherell, *J. Anal. Toxicol.* 25 (2001) 344.
- [16] M.D. Crouch, C.R. Short, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 61 (1978) 612.
- [17] L. Alliot, G. Bryant, P.S. Guth, *J. Chromatogr.* 232 (1982) 440.
- [18] R.T. Hunter, R.E. Creekmur, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67 (1984) 542.
- [19] J.J.L. Hoogenboom, C.G. Rammel, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68 (1985) 1131.
- [20] J.J. Johnston, E.E. Petty, I. Okano, D.L. Nolte, *J. Chromatogr. B* 670 (1995) 73.
- [21] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145.
- [22] S. Ulrich, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 167.
- [23] S. Magdic, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 723 (1996) 111.
- [24] M.T. Sng, F.K. Lee, H.Å. Lakso, *J. Chromatogr. A* 759 (1997) 225.
- [25] A. Nomen, M. Yashiki, N. Nagasawa, Y. Iwasaki, T. Kojima, *Forens. Sci. Int.* 88 (1997) 125.
- [26] J. Belmont, F.J. Lopez, O. Cepria, F. Hernandez, *J. Chromatogr. A* 808 (1998) 257.
- [27] A.L. Simplicio, L.V. Bous, *J. Chromatogr. A* 833 (1999) 35.

- [28] D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis, *J. Chromatogr. A* 922 (2001) 243.
- [29] F. Musshoff, H. Junker, B. Midea, *J. Chromatogr. Sci.* 40 (2002) 29.
- [30] H.L. Lord, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3899.
- [31] S.W. Myung, H.K. Min, S. Kim, M. Kim, J.B. Cho, T.J. Kim, *J. Chromatogr. B* 716 (1998) 359.
- [32] A.M. Bemajón, R. Saura, A.C.S. Lucas, M.J. Tabarnero, P. Fernández, R. Marsili, *J. Anal. Toxicol.* 24 (2000) 66.
- [33] F. Musshoff, H.P. Junker, D.W. Lachenmeier, L. Kroemer, B. Midea, *J. Chromatogr. Sci.* 40 (2002) 359.
- [34] H. Yuan, Z. Mester, H. Lord, J. Pawliszyn, *J. Anal. Toxicol.* 24 (2000) 718.
- [35] E.H.M. Koster, C. Wemes, J.B. Morsink, G.J. Jong, *J. Chromatogr. B* 739 (2000) 175.
- [36] K. Dien, C. Lenner, in: S.A. Ciba-Geigy (Ed.), *Tablas científicas*, Basel, 1975, pp. 284–288.
- [37] J. Pawliszyn, *Solid-phase Microextraction—Theory and Practice*, Wiley-VCH, New York, 1997, pp. 128–131.
- [38] A.C. Moffit, M.D. Osselson, B. Widdop (Eds.), *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, Pharmaceutical Press, London, 2004, pp. 1571–1572.

DETERMINATION OF QUINALPHOS IN BLOOD AND URINE BY DIRECT SOLID-PHASE MICROEXTRACTION COMBINED WITH GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

E. Gallardo^a, M. Barros^b, C. Margalho^b, A. Cruz^a, D.N. Vieira^b, M. López-Rivadulla^a

^a Instituto de Medicina Legal, Servicio de Toxicología Forense, Universidad de Santiago de Compostela, San Francisco s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain.

^b Instituto Nacional de Medicina Legal, Delegação de Coimbra, Largo da Sé Nova, 3000-213 Coimbra, Portugal.

Abstract

A new method based on direct solid-phase microextraction (DI-SPME) followed by gas chromatography/mass spectrometry was developed for the purpose of determining quinalphos in blood and urine. Two types of coated fibre have been assayed and compared: carbowaxTM/divinylbenzene (CW/DVB 65 μm), and polydimethylsiloxane (PDMS 100 μm). The main parameters affecting the SPME process such as temperature, salt addition, pH, stirring and adsorption/desorption time profiles were optimized to enhance the sensitivity of the procedure. The method was developed using only 100 μL of blood and urine. Limits of detection of the method for blood and urine matrices were respectively 10 and 2 ng/mL. Linearity was established over concentration ranges from 0.05 to 50 $\mu\text{g/mL}$ for blood, and 0.01 to 50 $\mu\text{g/mL}$ for urine, with regression coefficients ranging between 0.9991 and 0.9999. Intra- and interday precision values were less than 13%, and accuracy was within $\pm 15\%$ of the nominal concentration for all studied levels in both matrices. Absolute recoveries were 14% and 26 % for blood and urine, respectively.

Keywords: Solid-phase microextraction, quinalphos, gas chromatography.

1. Introduction

Quinalphos (O,O-diethyl O-quinoxalin-2-yl phosphorothioate) is an ester of phosphorothioic acid [1]. It was first introduced in Portugal in 1986 (Ekalux®), and nowadays is the major responsible for intoxications with organophosphorous insecticides in this country.

It is effective against both biting and sucking pests on vegetables, especially against the diamond-back moth, and also in the control of mosquitoes and mites [2, 3].

Organophosphorous compounds are by far the most important class of pesticides, both in terms of worldwide usage and their toxicity to humans [4].

These compounds are usually well absorbed by the gastrointestinal tract, but also by the skin and airways [5, 6]. Like other organophosphorous insecticides, quinalphos acts by inhibiting acetylcholinesterase (AChE) in the nervous tissue. This enzyme is responsible for the destruction and termination of the biological activity of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) [1, 6, 7]. Build-up of ACh at the neural junction leaves the muscles, glands and nerves in a constant state of stimulation, which produces a wide range of acute symptoms, such as dizziness, confusion and blurred vision, etc. Severe poisoning leads to coma, breathing difficulties, cyanosis and cardiac arrhythmias [4-7].

Solid phase microextraction (SPME) was developed by Arthur and Pawliszyn in the early 1990 at the University of Waterloo (Ontario, Canada) [8], and has a wide range of applications, namely in the determination of drugs of abuse [9-12], medical substances [13, 14], pesticides [15-19], and more recently strychnine [20].

The determination of quinalphos can be accomplished by means of liquid-liquid extraction [21-23], matrix solid-phase dispersion [24, 25], solid-phase extraction [26], or SPME. The application of this latter technique to the determination of quinalphos is described in honeybees [27], fruit and fruit juice [28], and blood [29]. To the best of our knowledge, the use of direct immersion SPME to determine quinalphos in blood and urine samples is not published in the literature.

This paper describes a new and sensitive method based on direct immersion SPME coupled to gas chromatography/electron impact ionization-mass spectrometry (GC/EI-MS) to determine quinalphos in whole blood and urine utilizing only 0.1 mL of sample.

2. Experimental

2.1. Reagents and equipment

Analytical standards, quinalphos and ethion, were purchased from Riedel-de Haën (Seelze, Germany) and Polyscience Corp. (Niles, IL, USA) respectively. Ethion, an organophosphorous insecticide not commercially available in Portugal, was used as internal standard (IS). Both pesticide standards were of 98-99% purity.

Methanol (HPLC grade), phosphoric acid, sodium hydrogenphosphate and sodium chloride (analytical grade) were obtained from Merck Co (Darmstadt, Germany).

Methanolic standard stock solutions at 1000 µg/mL were prepared and stored at -20 °C. Subsequently working solutions at 100, 10 and 1 µg/mL for quinalphos and at 100 µg/mL for ethion were prepared in methanol, and stored protected from light at 4 °C.

Phosphate buffer solutions (0.07 M) were prepared by mixing solutions of phosphoric acid and sodium hydrogenphosphate, in variable proportions, according to the desired pH [30].

Fresh human blood was obtained from the exceeding of the Portuguese Institute of Blood (outdated transfusions), preserved with citrate phosphate dextrose (1:7), and urine samples were obtained from healthy laboratory staff.

The SPME fibre holder for manual use and the coated fibres [100 µm Polydimethylsiloxane (PDMS) and 65 µm CarbowaxTM/Divinylbenzene (CW/DVB)] were obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA).

Chromatographic analysis was performed using a 6890 Series gas chromatograph (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany), equipped with a model 5973 mass selective detector (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany). A capillary column (12m x 0.25mm I.D., 0.25µm film thickness) packed with 5% phenylmethylsiloxane (Ultra 2), supplied by J & W Scientific (Folsom, CA, USA), was used.

The GC oven was kept at 100 °C for 2 min after which the temperature was raised by 10 °C min⁻¹ to 200 °C, and finally by 24 °C min⁻¹ to 270 °C, where it was kept constant for 2

min. The injector port and the detector temperatures were set at 240 °C and 280 °C respectively. Splitless injection mode was adopted, and helium, with a constant flow rate of 1 mL min⁻¹, was used as the carrier gas.

The mass spectrometer was operated with a filament current of 300 μA and an electron energy of 70 eV in the electron impact (EI) mode. Quantitation was done in the selected ion monitoring (SIM) mode, and the ions were monitored at m/z 146, 157 and 118 for quinalphos, and at m/z 231, 153 and 125 for ethion (quantitation ions are underlined).

The retention times were 12.84 and 14.56 minutes for quinalphos and ethion respectively, obtaining a good separation of both compounds.

2.2. Extraction procedure

New fibres were conditioned in the injector of the GC system as follows: PDMS fibres were heated at 250 °C for 30 minutes and CW/DVB at 220 °C for 30 minutes, according to the suppliers' specifications. The fibres were also cleaned every day prior to the first extraction by desorption in the injection port for 2 minutes.

2.1.1. SPME procedure for blood

For sample preparation was added 1 μg of IS to 100 μL of blood, and a final volume of 1 mL was obtained with water. The sample was then agitated for 30 seconds, and a CW/DVB coated fibre was directly immersed in it for 60 minutes at 60°C. After extraction the fibre was washed by immersion in deionised water for 5 seconds, and thermally desorbed in the injection port of the GC system for 1 min, after which the chromatographic run was started.

2.1.2. SPME procedure for urine

The SPME procedure for urine samples was similar to that of blood, except that the extraction was performed at 90 °C instead of 60 °C, and the washing step was not necessary.

The coated fibres lasted more than 100 reproducible extractions, inclusively in blood, for which may have contributed the washing step prior to desorption.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of SPME

The different parameters that can affect the SPME process, such as type of coated fibre, adsorption and desorption time profiles, temperature, agitation, salt addition, and pH were optimized for each particular sample (blood and urine), analyzing samples spiked with 1 µg/mL of quinalphos (n=3).

3.1.1. Selection of fibre coating

The choice of an appropriate coating is essential for the SPME method, because the sensitivity of each fibre is different depending on the molecular mass and the polarity of the analytes to be extracted. Two types of fibre coating were tested: the 100 µm PDMS and the 65 µm CW/DVB. To select the best coated fibre, samples of blood and urine were spiked with quinalphos at 1 µg/mL, and were extracted using both fibres. After 40 minutes of extraction, the fibres were retracted and desorpted in the injector port of the GC for 3 minutes, and the obtained chromatograms were compared (in terms of peak area of quinalphos). For each fibre, the measured peak area in the chromatogram was compared with that obtained by direct injection of 1 µL of a methanolic solution with the same concentration. CW/DVB fibre extracted about 3 times more analyte than PDMS, and therefore the latter was excluded from the study.

3.1.2. Adsorption and desorption times

Solid phase microextraction is an equilibrium process that involves partitioning of analytes between two phases: an aqueous or gaseous phase (the sample) and a solid phase (the fibre coating). Therefore, the optimization of the contact time between these two phases is crucial. To find the best adsorption time, the fibre was directly immersed in the samples (blood and urine spiked with 1 µg/mL of quinalphos) for 1, 5, 10, 15, 25, 35, 40, 60, 90, and 180 minutes, followed by a desorption of 3 minutes at 240 °C in the injector

port of the CG. The extraction time profile was established by plotting the area counts against the extraction time. Equilibrium was not reached even after 180 minutes of contact, and therefore it was necessary to establish a good compromise between extraction yield and extraction time. This way, an extraction time of 60 minutes was chosen for each matrix. This was possible because SPME is a quantitative method at every time of the extraction time profile [31], and sensitivity was sufficient prior to equilibrium. Longer adsorption times were not chosen, because the advantages of the technique would be wasted (one advantage of SPME lays in its fastness).

The optimization of desorption time aims at achieving the complete desorption of the adsorbed analyte, to improve sensitivity, and simultaneously avoid carry-over effects.

After extraction of spiked blood and urine samples for 60 minutes, the fibre was desorpted at 240 °C in the injection port of the GC for 1, 2, 3, 4 and 6 minutes. On the basis of peak areas evaluation the best desorption time was 1 minute.

To test for carry-over effects, samples containing high amounts of quinalphos (100 µg/mL) were extracted for 60 minutes, and the fibre was desorpted in the injector of the GC for 1 minute. After the chromatographic run, the fibre was immediately desorpted again, to test for remains of the pesticide that would contaminate further analyses. No peaks were observed after this second desorption, and therefore the elected time for desorption was 1 minute.

3.1.3. Temperature effect

With the purpose of enhancing the extraction yield, it's common to heat the samples when working with SPME, mainly in the headspace sampling technique. To evaluate the temperature effect on the extraction yield, spiked samples of blood and urine were extracted at different temperatures (room temperature, 40, 50, 60, 70, 80 and 90 °C for urine samples; and room temperature, 40, 50, 60 and 70 °C for blood samples) for 60 minutes.

We observed that the extraction yield increased with the temperature increase, and the chosen temperatures were 90 °C for urine and 60 °C for blood. A 60 minutes extraction of urine samples at 90 °C showed even better results than 180 minutes at room temperature. Furthermore, at 90 °C, the extraction of quinalphos from urine was increased by a factor

of 7, when compared to room temperature. Blood samples could not be heated above 60 °C, because of coagulation (we experienced coagulation of the samples at 70 °C), and a 60 minutes extraction at this temperature yielded similar amounts of the pesticide when compared to a 180 minutes extraction at room temperature.

These results are apparently in disagreement with Ulrich's review on SPME [31], in which the temperature increase is responsible for a loss in sensitivity. However, this loss of sensitivity refers to the equilibrium state, and as seen in the previous section, equilibrium was not reached even after 180 minutes of extraction. Therefore, it's possible that our increase in sensitivity was due to the fact that the chosen time for extraction was not the equilibrium time for quinalphos.

3.1.4. Effect of agitation

To evaluate the influence of agitation on the extracted amount of quinalphos, spiked blood and urine samples at 1 µg/mL were analyzed with, and without agitation during the adsorption process, and both peak areas were compared. Sample agitation did not improve significantly the extraction yield.

3.1.5. Effect of salt addition and pH modification

To enhance the extraction of organic analytes from aqueous matrices it is common to use pH adjustment and salting. The pH of the sample has an important role in SPME, as it affects acid-base equilibrium between the ionized species of the analyte, and hence the extraction yield. The effect of pH on the extraction yield was evaluated by diluting spiked blood and urine samples at 1 µg/mL in phosphate buffer 0.07 M (pH 5-8) instead of water. The peak areas obtained for each of the pH values were compared. The pH of the sample didn't affect significantly the extraction of quinalphos from a blood sample, and the results were similar to those obtained by diluting the sample with water. On the other hand, it was observed a slight decrease in the extracted amount with the pH increase in urine, and the best results were obtained after diluting the sample with water. This may have been due to a possible effect of an increase in salt concentration derived from the phosphate buffer. The effect of ionic strength on extraction efficiency was evaluated by analyzing the amount of quinalphos extracted in sample solutions containing 0, 0.375,

0.75, 1.5, 3, 5 and 10% of sodium chloride. The extracted amount decayed dramatically with the increase of salt concentration in the sample, which corroborates the results obtained in the pH experiments.

Therefore, this study was performed without salt addition or pH changes.

3.2. Validation procedure

Method validation was performed in order to study selectivity, linearity, precision and accuracy (intra and interday), recovery, limits (of detection and quantitation), and stability, according to internationally accepted criteria [32, 33].

Selectivity was examined by analyzing 10 blank blood and urine samples (of different origin), and comparison of the obtained chromatograms with those obtained spiking the samples with both compounds at low concentrations (0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for urine, and 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for blood). The influence of other substances that might eventually be present (other organophosphorous compounds, pyrethroids, caffeine, etc), was also evaluated by spiking urine and blood samples with high concentrations of these compounds and low amounts of the analyte, and could be excluded due to different retention times and/or mass spectra. As can be seen in figure 1, no interferences were observed.

In order to determine calibration curves, blood and urine samples were spiked with quinalphos at final concentrations ranging from 0.05 to 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and 0.01 to 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. These samples were prepared and analyzed using the above mentioned procedures. The calibration curves were obtained by plotting the peak-area ratio between analyte and IS against analyte concentration, obtaining coefficients of correlation ranging from 0.9991 to 0.9998 (Table 1). Calibrator's accuracy was within $\pm 15\%$ of the nominal concentration ($\pm 20\%$ at LLOQ) for all concentration levels, and was considered acceptable according to the FDA's guidelines for bioanalytical method validation [32].

Limit of detection (LOD) was defined as the lowest amount of quinalphos in the sample which could be detected but not necessarily quantitated, and yielding a signal-to-noise ratio of at least 3.

Limit of quantitation (LOQ) was defined as the minimum concentration of quinalphos that could be measured reproducibly and accurately ($CV \leq 20\%$ and bias $\pm 20\%$ of the nominal concentration). These limits are presented in Table 1.

It should be stated that LOD and LOQ in blood were obtained utilizing only 100 μL of sample, and were close to analytical limits for quinalphos determination in blood using SPME that have been published elsewhere [29]. However, these published results refer to a sample volume of 500 μL , and the sampling technique was headspace-SPME. We believe that the use of a quite high temperature while extracting the blood samples have contributed to the low limits obtained. Regarding the results in urine, it's not possible to compare the limits, since the determination of quinalphos in this matrix is not published yet.

Intra- and interday precision and accuracy were estimated at several concentrations evenly distributed over the calibration range (0.25, 2.50, 10.0, 25.0 and 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for blood; and 0.05, 0.50, 0.25, 10.0, 25.0 and 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for urine), with six replicates for each level. For intraday precision, sets of samples spiked at the chosen concentrations were analyzed in the same day, and the correspondent coefficients of variation (CV, %) were calculated. Interday precision was assessed in a similar way, analyzing spiked samples on different days over a period of ten months. The calculated CVs were less than 15% for all concentration levels. Furthermore, accuracy (bias, %) of intra- and interday precision assays was within $\pm 15\%$ of the nominal concentration (Table 2), fulfilling internationally accepted criteria [32-34].

For the determination of absolute recovery, blood and urine samples spiked with quinalphos at 3 concentration levels (0.50, 5.0 and 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were analyzed, and peak areas were compared with those obtained by a splitless injection of 1 μL of a methanolic solution containing the same amount of the analyte. Mean recoveries are shown in Table 2. These recovery values were higher than those normally seen in SPME methods [20], namely in the determination of organophosphorous compounds [29]. This may be explained by the effect of the temperature at which the extractions were performed.

In order to study stability in processed samples at two concentration levels, blood and urine were spiked with 0.25 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of quinalphos, and extracted using the above mentioned procedures ($n=3$). After extraction the fibre was retracted, but it was not

desorpted immediately in the injector of the GC, however. Instead of that, the fibre was left standing for controlled time intervals (5, 10, 15, 20 and 30 minutes) before desorption. The measured concentrations for each tested time did not deviate more than 10% from the nominal concentration.

Short-term stability was evaluated at the same concentration levels (n=3). Blood and urine were spiked with 0.25 and 10 µg/mL of quinalphos, and these samples were left at room temperature for 18 h. The measured concentrations did not deviate more than 10% from the nominal concentration.

Finally the described methods were successfully applied to authentic samples proceeding from medico-legal autopsies, as well as hospital cases, obtained from the Laboratory of Forensic Toxicology (Delegation of Coimbra, National Institute of Legal Medicine, Portugal).

4. Conclusions

DI-SPME coupled to GC/EI-MS has showed to be a fast and simple solvent-free method to determine quinalphos in blood and urine samples. The methodology was selective, precise, accurate and sensitive enough for application in forensic toxicology routine analysis for the quantitation of this compound in blood and urine specimens. Furthermore, both techniques require only 100 µL of sample to accomplish the analysis, which is extremely useful when the available sample volume is small.

References

- [1] D.J. Ecobichon, in C.D. Klaassen (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology – the basic science of poisons, 5th ed. McGraw-Hill, New York, 1996, p. 643.
- [2] M. Eto. Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry. CRC Press, Inc., Cleveland, 1974.
- [3] C.D.S. Tomlin (Ed.). The pesticide manual. 11th ed. British Crop Protection Council, Surrey, 1997.
- [4] M. Kała, in A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop (Eds.), Clarke's Analysis of drugs and poisons. Pharmaceutical Press, London, 2004, p.203.
- [5] J. Ladrón de Guevara, V. Moya Pueyo, in J. Ladrón de Guevara, V. Moya Pueyo (Eds.), Toxicología médica – clínica y laboral. Interamericana McGraw-Hill, New York, 1995, p. 459.
- [6] J.A. Gisbert Calabuig, E. Villanueva Cañadas, in J.A. Gisbert Calabuig (Ed.), Medicina legal y toxicología, 5th ed. Masson, SA, Barcelona, 1998, p. 806.
- [7] M.J. Ellenhorn, S. Schonwald, G. Ordog, J. Wasserberger, in M.J. Ellenhorn (Ed.), Ellenhorn's medical toxicology: Diagnosis and treatment of human poisoning, 2nd ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 1997, p. 1614.
- [8] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 62 (1990) 2145.
- [9] H.L. Lord, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 69 (1997) 3899.
- [10] S.W. Myung, H.K. Min, S. Kim, M. Kim, J.B. Cho, T.J. Kim, J. Chromatogr. B 716 (1998) 359.
- [11] A.M. Bermejo, R. Seara, A.C.S. Lucas, M.J. Tabernero, P. Fernández, R. Marsili, J. Anal. Toxicol. 24 (2000) 66.
- [12] F. Musshoff, H.P. Junker, D.W. Lachenmeier, L. Kroener, B. Madea, J. Chromatogr. Sci. 40 (2002) 359.
- [13] H. Yuan, Z. Mester, H. Lord, J. Pawliszyn, J. Anal. Toxicol. 24 (2000) 718.
- [14] E.H.M. Koster, C. Wemes, J.B. Morsink, G.J. Jong, J. Chromatogr. B 739 (2000) 175.
- [15] S. Magdic, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A 723 (1996) 111.
- [16] M.T. Sng, F.K. Lee, H.Å. Lakso, J. Chromatogr. A 759 (1997) 225.

- [17] A. Namera, M. Yashiki, N. Nagasawa, Y. Iwasaki, T. Kojima, *Forensic Sci. Int.* 88 (1997) 125.
- [18] J. Beltran, F.J. Lopez, O. Cepria, F. Hernandez, *J. Chromatogr. A* 808 (1998) 257.
- [19] D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis, *J. Chromatogr. A* 922 (2001) 243.
- [20] M. Barroso, E. Gallardo, C. Margalho, S. Ávila, E.P. Marques, D.N. Vieira, M. López-Rivadulla, *J. Chromatogr. B* 816 (2005) 29.
- [21] J. Oliva, A. Barba, N. Vela, F. Melendreras, S. Navarro, *J. Chromatogr. A* 882 (2000) 213.
- [22] V.K. Sharma, R.K. Jadhav, G.J. Rao, A.K Saraf, H. Chandra, *Forensic Sci. Int.* 48 (1990) 21.
- [23] J. Wu, L. Li, *J. AOAC Int.* 87 (2004) 1260.
- [24] C.M. Torres, Y. Picó, R. Marín, J. Mañes, *J. AOAC Int.* 80 (1997) 1122.
- [25] C. Sánchez-Brunete, B. Albero, E. Miguel, J.L. Tadeo, *J. AOAC Int.* 85 (2002) 128.
- [26] A. Di Muccio, P. Pelosi, I. Camoni, D.A. Barbini, R. Dommarco, T. Generali, A. Ausili, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 497.
- [27] M. Fernández, C. Padrón, L. Marconi, S. Ghini, R. Colombo, A.G. Sabatini, S. Girotti, *J. Chromatogr. A* 922 (2001) 257.
- [28] A.L. Simplício, L.V. Boas, *J. Chromatogr. A* 833 (1999) 35.
- [29] F. Musshoff, H. Junker, B. Madea, *J. Chromatogr. Sci.* 40 (2002) 29.
- [30] K. Dien, C. Lentner. *Tablas científicas*. Ciba-Geigy S.A., Basel, 1975.
- [31] S. Ulrich, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 167.
- [32] Food and Drug Administration: U.S. Department of Health and Human Services, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. FDA [document online] [cited 21st January 2003]. Available from URL: www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf.
- [33] International Conference on Harmonization (ICH), Validation of Analytical Procedures: Methodology ICH Q2 B. ICH [document online] [cited 21st January 2003]. Available from URL: www.ich.org/MediaServer.jserv?@_ID=4188@_MODE=GLB.
- [34] F.T. Peters, H.H. Maurer, Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – a review. *Accredit. Qual. Assur.* 7 (2002) 441.

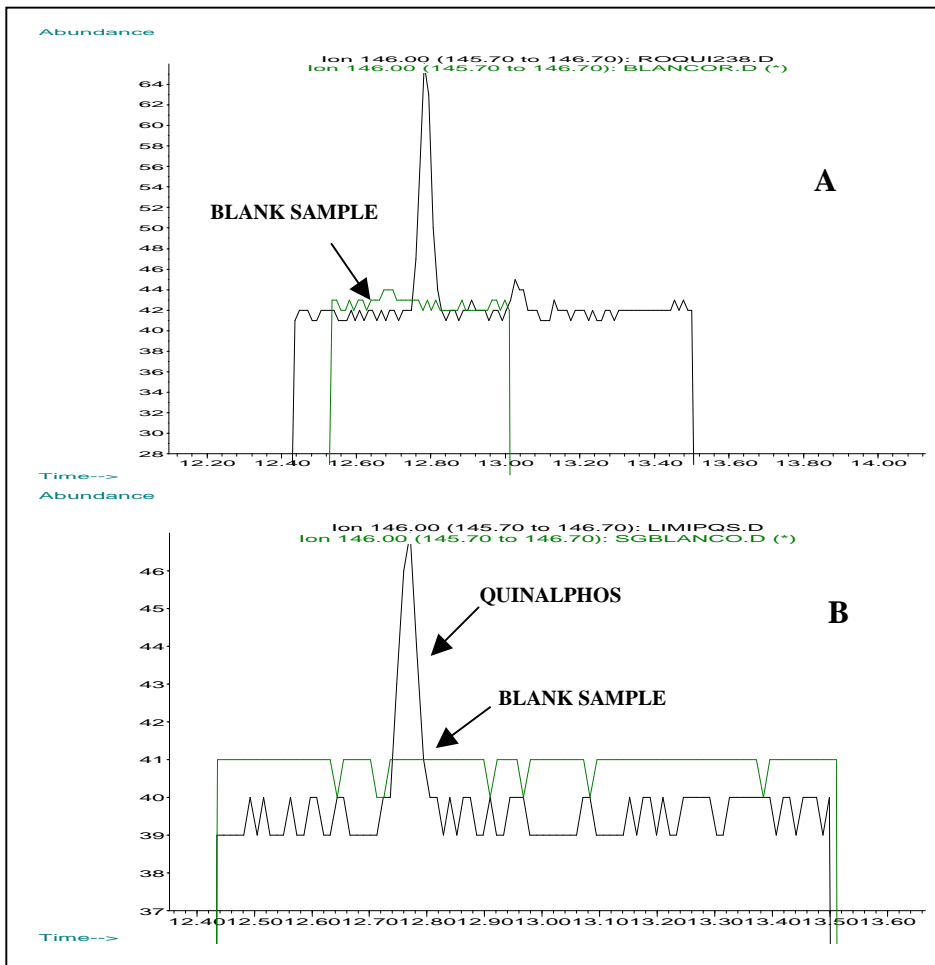


Figure 1. Merged fragmentograms (ion 146) obtained from urine (A) and blood (B) samples spiked with a low concentration of quinalphos (10 and 50 ng/mL respectively), and from blank samples.

Table 1. Analytical performance of both methods for the analysis of quinalphos in blood and urine

Sample	Calibration		R ² values	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
	range (µg/mL)	Linearity (n=7)			
Blood	0.05 - 5.00	y=0.0912x+0.0091	0.9993	10	50
	5.00 - 50.0	y=0.1225x-0.1654	0.9999		
Urine	0.01 - 0.50	y=0.0236x-0.0001	0.9998	2	10
	0.50 - 50.0	y=0.0318x-0.0057	0.9991		

Table 2. Precision, accuracy, and recovery

Sample	Recovery (%)	Concentration (µg/mL)	Intraday precision			Interday precision		
			Concentration mean (µg/mL)	C.V. (%)	Bias (%)	Concentration mean (µg/mL)	C.V. (%)	Bias (%)
Blood	14.5	0.25	0.25	9.13	2.01	0.27	9.67	10.52
		2.50	2.54	4.22	1.63	2.36	8.60	-5.53
		10.0	10.47	8.33	4.73	9.56	7.89	-4.41
		25.0	23.46	7.86	-6.17	27.10	2.28	8.39
		50.0	53.36	5.63	6.70	45.09	6.67	-9.82
Urine	26.3	0.05	0.04	13.09	-14.61	0.05	4.68	1.10
		0.50	0.54	3.06	8.61	0.53	8.69	6.67
		0.25	0.23	4.02	-6.01	2.33	5.48	-6.66
		10.0	9.51	2.92	-4.86	9.78	2.15	-2.21
		25.0	24.73	3.05	-1.09	24.41	5.77	-2.35
		50.0	51.43	1.55	2.85	50.08	3.54	0.17

n=6; Bias=[(measured concentration-nominal concentration)/nominal concentration]×100

SOLID-PHASE MICROEXTRACTION FOR GAS CHROMATOGRAPHIC MASS SPECTROMETRIC ANALYSIS OF DIMETHOATE IN BIOLOGICAL HUMAN SAMPLES.

E. Gallardo¹, M. Barroso², C. Margalho², A. Cruz¹, D.N. Vieira², M. López-Rivadulla¹

¹ Instituto de Medicina Legal, Servicio de Toxicología Forense, Universidad de Santiago de Compostela, San Francisco s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain.

² Instituto Nacional de Medicina Legal, Delegação de Coimbra, Largo da Sé Nova, 3000-213 Coimbra, Portugal.

Abstract

A new, simple and rapid procedure for the determination of dimethoate in urine and blood samples was developed using direct immersion (DI) solid phase microextraction (SPME) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). This technique required only 0.1 mL of sample, and ethion was used as internal standard (IS). Two types of coated fibre were compared (100 μm Polydimethylsiloxane, and 65 μm CarbowaxTM/Divinylbenzene). Another parameters such as extraction temperature, adsorption and desorption time, salt addition, agitation and pH effect were optimized to enhance the sensitivity of the method. Limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were 50 and 100 ng/mL for urine and, 200 and 500 ng/mL for blood, respectively. The method was found to be linear between the LOQ and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for urine, and between the LOQ and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for blood, with correlation coefficients ranging from 0.9923 to 0.9996. Precision (intra and interday) and accuracy were in conformity with the criteria normally accepted in bioanalytical method validation. The mean absolute recoveries of dimethoate were 1.24 and 0.50 % for urine and blood, respectively. Because of its simplicity and the fact that small volumes of sample are used, the described method can be successfully used in the diagnosis of intoxications by this pesticide, namely in those situations where the sample volume is limited, as frequently occur in forensic toxicology.

Keywords: Solid-phase microextraction; dimethoate; biological samples.

Introduction

Dimethoate [Dimethyl S-(N-methylcarbamoylmethyl) phosphorothiolothionate] [1] is an organophosphate that has been used commercially as a pesticide since 1956 [2]. It is used against a wide range of insects, including aphids, thrips, planthoppers and whiteflies on ornamental plants, vegetables, cotton, and fruit crops [1, 3].

It is a white solid substance and it is freely soluble in most organic solvents except saturated hydrocarbons [4]. It is readily absorbed from the gastrointestinal tract and to a lesser extent through the intact skin and by inhalation [5-7], and rapidly excreted (up to 90% urinary excretion within 24 h). Dimethoate does not accumulate in fat tissue [8]. Oral dimethoate is hydrolysed in the liver, yielding its oxygen analogue, the active form [5].

Like other organophosphorous insecticides, dimethoate acts by inhibiting acetylcholinesterase in the nervous tissue. This enzyme is responsible for the destruction and termination of the biological activity of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) [7, 9, 10]. Build-up of ACh at the neural junction leaves the muscles, glands and nerves in a constant state of stimulation, which produces a wide range of acute symptoms, such as dizziness, confusion and blurred vision, etc. Severe poisoning leads to coma, breathing difficulties, cyanosis and cardiac arrhythmias [4, 6, 7, 10].

Blood concentrations of 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and urine concentrations ranging from 10 to 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ have been found in fatalities [11].

The determination of dimethoate in biological fluids has been accomplished by means of solid phase extraction (SPE) followed by gas chromatography with either flame photometric detection [12], or nitrogen and phosphorus detection (NPD) [13]. Liquid-liquid extraction (LLE) followed by gas chromatography with NPD has also been used [13]. Furthermore, a high-performance thin-layer chromatography method after a sample cleanup procedure using SPE and LLE is described [14].

Solid-phase microextraction was developed by Arthur and Pawliszyn at the University of Waterloo (Ontario, Canada) in the early 1990 [15]. This sampling preparation technique displays some advantages over SPE and LLE, since it does not require the use of organic

solvents, the handling of samples is easy and fast, and the equipment necessary to accomplish the analysis is simple [16]. This method has a wide range of applications in biomedical analysis, namely in the determination of drugs of abuse [17-20] and medical substances [21, 22]. To the best of our knowledge, only one paper [23] refers the application of SPME to the measurement of dimethoate in blood. However, no validation data is given. Furthermore, the determination of this pesticide in urine samples is not published in the literature.

This paper describes a new method based on direct immersion solid-phase microextraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry to determine dimethoate in blood and urine specimens.

2. Experimental

2.1. Reagents and standards

Analytical standards, dimethoate and ethion, were purchased from Riedel-de Haën (Seelze, Germany) and Polyscience Corp. (Niles, IL, USA) respectively. Ethion, an organophosphorous insecticide not commercially available in Portugal, was used as internal standard (IS). Both pesticide standards were of 98-99% purity.

Methanol (HPLC grade), phosphoric acid, sodium hydrogenphosphate and sodium chloride (analytical grade) were obtained from Merck Co (Darmstadt, Germany).

Stock standard solutions of 1000 µg/mL for each compound were prepared in methanol and stored at -20 °C in the dark, conditions under which they were stable for at least six months. Subsequently working solutions at 100, 10 and 1 µg/mL for dimethoate and 100 µg/mL for ethion were prepared by diluting the stock solutions with methanol. These solutions were stored protected from light at 4 °C.

Phosphate buffer solutions (0.07 M) were prepared by mixing solutions of phosphoric acid and sodium hydrogenphosphate, in variable proportions, according to the desired pH [24].

2.2. SPME fibres

The SPME device and coated fibres [100 µm Polydimethylsiloxane (PDMS) and 65 µm Carbowax™/Divinylbenzene (CW/DVB)] were supplied by Supelco (Bellefonte, PA, USA). Before the first use, the fibres were conditioned for 30 minutes in the hot port of the GC, at 250 °C (PDMS) and 220°C (CW/CVB), in accordance with the suppliers' instructions.

2.3. Biological samples

Fresh human blood was obtained from the exceeding of the Portuguese Institute of Blood (outdated transfusions), preserved with citrate phosphate dextrose (1:7), and stored at -18 °C until analysis. Urine specimens were obtained from healthy supposed non-exposed subjects.

2.4. Gas Chromatographic conditions

Chromatographic analysis was performed using an HP 6890 Series gas chromatograph (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany), equipped with a model 5973 mass selective detector (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany). A capillary column (12m x 0.25-mm I.D., 0.25-µm film thickness) packed with 5% phenylmethylsiloxane (Ultra 2), supplied by J & W Scientific (Folsom, CA, USA), was used.

Chromatographic conditions were as follows: initial oven temperature was 100 °C for 2 minutes, which was increased by 10 °C min⁻¹ to 200 °C, and finally elevated by 24 °C min⁻¹ to 270 °C, held for 2 min. The temperatures of the injection port and detector were set at 240 and 280°C, respectively. The splitless injection mode was used, and helium with a flow rate of 1mL min⁻¹ was used as the carrier gas. The mass spectrometer was operated with a filament current of 300 µA and an electron energy of 70 eV in the electron impact (EI) mode. Quantitation was done in the selected ion monitoring (SIM) mode, and the ions were monitored at *m/z* 87, 93 and 125 for dimethoate, and at *m/z* 231, 153 and 125 for ethion (quantitation ions are underlined).

The retention times were 9.05 and 14.56 minutes for dimethoate and IS respectively, obtaining a good separation of both compounds.

2.5. SPME procedures

2.5.1. Blood

For sample preparation was added 1 µg of IS to 100 µL of blood, and a final volume of 1 mL was obtained with water. The sample was then agitated for 30 seconds, and a CW/DVB coated fibre was directly immersed in it for 60 minutes at 60°C. After extraction the fibre was washed by immersion in deionised water for 5 seconds, and thermally desorbed in the injection port of the GC system (240 °C) for 1 min, after which the chromatographic run was started.

2.5.2. Urine

The SPME procedure for urine samples was similar to that of blood, except that the extraction was performed at room temperature, and the washing step was not necessary.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of SPME

The parameters that could influence the SPME process, such as type of coated fibre, adsorption and desorption time profiles, extraction temperature, agitation, salt addition, and pH were optimized for each particular sample (blood and urine), analyzing samples spiked with 1 µg/mL of dimethoate (n=3).

Two types of fibre coating were assayed: 100 µm PDMS and 65 µm CW/DVB. The CW/DVB fibre was chosen for the development and validation of the analytical procedures, since the extracted amounts of dimethoate were more than 60 times higher with this coated fibre than those obtained with the PDMS one in both matrices.

The extraction mechanism in SPME involves partitioning of the analyte between the sample and the fibre coating. As it is an extraction based on equilibrium, rather than exhaustive, the optimization of the contact time between the mentioned two phases is a crucial feature in method development. To find the best extraction time, a CW/DVB fibre was directly exposed to samples of blood and urine spiked with 1 µg/mL of dimethoate for several controlled times (1, 5, 10, 15, 25, 35, 40, 60, 90, and 180 minutes). After each

extraction the fibre was retracted and desorpted at 240 °C in the injector port of the CG for a period of 3 minutes. To establish the extraction time profile, the area counts obtained for each extraction were plotted against the extraction time. We observed an increase in the extracted amount with the increase in the extraction times, and the best results were obtained for a 180 minutes extraction. However, the extracted amount was only slightly higher when compared to a 60 minutes extraction. As SPME is a quantitative technique at every time of the extraction time profile [25], it was decided to choose an extraction time of 60 minutes, because the aim of a rapid method would be wasted for longer extraction times. Furthermore, the sensitivity of the technique prior to equilibrium was sufficient to allow the determination of dimethoate in blood and urine specimens.

Desorption of the coated fibres after the extraction aims at achieving the complete desorption of the adsorbed analyte, to improve the method's sensitivity. On the other hand, because a single coated fibre is designed to last for several extraction/desorption cycles, the carry-over of analyte from one analysis to another is an important feature that must be excluded during method development.

To study the best desorption time, blood and urine samples spiked with 1 µg/mL of dimethoate were extracted during 60 minutes, after which the fibre was desorpted at 240 °C in the injection port of the GC for 1, 2, 3, 4 and 6 minutes. On the basis of peak areas evaluation the best desorption time was 1 minute.

The possibility of carry-over effects was evaluated by analysis of samples containing high amounts of dimethoate (100 µg/mL). After a 60 minutes extraction, the fibre was desorpted in the injector of the GC for 1 minute. After the chromatographic run, the fibre was immediately desorpted again, to test for remains of the pesticide that would contaminate further analyses. No peaks were observed after this second desorption, which excluded carry-over effects.

To enhance the extraction yield, it's common to heat the samples during the extraction, mainly in the headspace sampling technique. To evaluate the temperature effect on the extraction yield, spiked samples of blood and urine were extracted at different temperatures (room temperature, 40, 50, 60, 70, 80 and 90 °C for urine samples; and room temperature, 40, 50, 60 and 70 °C for blood samples) during 60 minutes.

The extraction yield decreased dramatically with the temperature increase in urine samples, and it was decided to perform the extractions in this specimen at room temperature. On the other hand, it was observed an increase in the extraction yield with the temperature increase in blood samples, and the elected temperature for extraction was 60 °C. Blood samples could not be heated above 60 °C, because of coagulation (we experienced coagulation of the samples at 70 °C).

The results obtained in blood samples are apparently in disagreement with Ulrich's review on SPME [25], in which a temperature increase is responsible for a loss in sensitivity. However, this loss of sensitivity refers to the equilibrium state, and our elected extraction time was not the equilibrium time for dimethoate, which may explain the observed increase in sensitivity.

To evaluate the influence of agitation on the extracted amount of dimethoate, spiked blood and urine samples at 1 µg/mL were analyzed with, and without agitation during the adsorption process, and both peak areas were compared. Sample agitation did not improve significantly the extraction yield, and therefore it was decided not to agitate the samples during the extraction, as it would complicate the process.

The effect of pH on the extraction yield was evaluated by diluting spiked blood and urine samples at 1 µg/mL in phosphate buffer 0.07 M (pH 5-8) instead of water. The peak areas obtained for each of the pH values were compared. The pH of the sample didn't affect significantly the extraction of dimethoate from a blood sample, and the results were similar to those obtained by diluting the sample with water. On the other hand, it was observed a decrease in the extracted amount with the pH increase in urine, and the best results were obtained after diluting the sample with water. This may have been due to a possible effect of an increase in salt concentration derived from the phosphate buffer. The effect of ionic strength on extraction efficiency was evaluated by analyzing the amount of dimethoate extracted in sample solutions containing 0, 0.375, 0.75, 1.5, 3, 5 and 10% of sodium chloride. The extracted amount decayed with the increase of salt concentration in the sample, and therefore this study was performed without salt addition.

3.2. Validation procedure

The analytical validation was performed according to the guiding principles of the FDA and ICH [26, 27]. The procedures were validated in terms of selectivity, linearity, limits of detection and quantitation, precision, accuracy, recovery, stability and effect of sample dilution.

3.2.1. Selectivity

Method selectivity was checked by analysis of 10 blank samples of different origin and comparison of the obtained chromatograms with those obtained using spiked blood (1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and urine (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) samples. The influence of other substances that might eventually be present (other organophosphorous compounds, pyrethroids, caffeine, etc), was also evaluated by spiking urine and blood samples with high concentrations of these compounds and low amounts of the analyte, and could be excluded due to different retention times and/or mass spectra. No interfering peaks were observed at the retention times and selected ions of dimethoate and ethion (Figures 1 and 2) for both biological specimens.

3.2.2. Calibration curve and limits

To determine the linearity of the method, blood and urine samples spiked with dimethoate at final concentrations ranging from 0.5 to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and 0.1 to 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively (ten calibrators each, with six replicates), were prepared and analyzing using the described procedure. The calibration curve was obtained by plotting the peak- area ratio between dimethoate and IS against the dimethoate concentration (Table 1). Calibrator's accuracy [mean relative error (bias) between measured and spiked concentrations] was within $\pm 14\%$ of the true values for all concentrations levels in urine, and $\pm 12\%$ in blood. The limits of quantitation (LOQ), defined as the lowest concentration of dimethoate that could be measured reproducibly and accurately (CV $<20\%$ and bias $\pm 20\%$), were 0.1 and 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for urine and blood, respectively. The limits of detection (LOD), defined as the lowest tested concentration yielding a signal-to-noise ratio higher than 3, was 50 ng/mL in urine and 200 ng/mL in blood. These quite low limits were obtained using only 0.1 mL of sample, which means that this reduced

sample volume does not limit the usefulness of the technique, as the concentrations normally seen in intoxications are frequently higher than these values. Therefore, the herein described methods can be successfully applied to determine dimethoate in blood and urine specimens. Furthermore, this small sample volume can be extremely useful in situations where there is very little available sample, and/or further analyses are required. It was not possible to compare these results with other authors, because the determination of this compound in these specimens by means of SPME is not published yet.

3.2.3. Precision and accuracy

Precision was evaluated at five concentration levels (0.1, 0.5, 2.5, 10.0 and 40.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for urine, and 0.5, 2.5, 10.0, 25.0 and 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for blood) analyzing six replicates for each concentration in the same day (intraday precision), and on different days over an one month period (interday precision). The obtained coefficients of variation did not exceed 15% for all studied concentrations in both matrices. These values for precision fell well within the criteria normally accepted in bioanalytical methods validation [26, 27]. The values obtained for accuracy (in terms of bias) were considered acceptable (Table 2).

3.2.4. Absolute recovery

Recoveries were determined in sixtriplicates at concentrations of 0.5, 5.0 and 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of dimethoate in urine and blood. Blood and urine samples were spiked with dimethoate and analyzed using the above mentioned procedures. Peak areas obtained were compared with those obtained from a splitless injection of 1 μL of methanolic solutions containing the same amount of the analyte. The mean calculates values were 1.24 % for urine and 0.50 % for blood.

3.2.5. Dilution effect

The validation of a partial sample volume was done by spiking blood and urine samples with concentrations above the higher level of calibration. Five replicates of each sample were analyzed after appropriate dilution with blank matrix to the validated concentration range (dilution factors of 2, 4, and 10). The calculated concentrations of these diluted

samples, after multiplication by their respective dilution factors, fell well within the adopted precision and accuracy criteria.

3.2.6. Stability

In order to study stability in processed samples at two concentration levels, blood and urine were spiked with 0.25 and 10 µg/mL of dimethoate, and extracted using the above mentioned procedures (n=3). After extraction the fibre was retracted, but it was not desorpted immediately in the injector of the GC, however. Instead of that, the fibre was left standing for controlled time intervals (5, 10, 15, 20 and 30 minutes) before desorption. The measured concentrations for each tested time did not deviate more than 10% from the nominal concentration.

Short-term stability was evaluated at the same concentration levels (n=3). Blood and urine were spiked and these samples were left at room temperature for 18 h. The obtained CVs and bias were considered acceptable.

Once validated, the proposed method was applied to authentic blood and urine samples, obtained from the Laboratory of Forensic Toxicology, Delegation of Coimbra, National Institute of Legal Medicine, Portugal.

4. Conclusions

In summary, we have developed a simple and rapid method for dimethoate quantification in blood and urine by using SPME. The procedure showed to be sensitive and specific enough as to detect 50 and 200 ng/mL of dimethoate in urine and blood, respectively, using only 0.1 mL of sample. It has been completely validated, including dilution and stability, showing excellent results for all the studied parameters.

References

- [1] Eto M. Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry. Cleveland: CRC Press; 1974.
- [2] Baselt RC. Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 7th ed. Foster City: Biomedical Publications; 2004, 351-352.
- [3] Tomlin CDS (Ed.). The pesticide manual. 11th ed. British Crop Protection Council, Surrey, 1997.
- [4] Kała M. In: Moffat AC, Osselton MD, Widdop B (Eds.). Clarke's Analysis of drugs and poisons. 3rd ed. London: Pharmaceutical Press; 2004, 202-226.
- [5] World Health Organization and Food and Agriculture Organization. Data Sheets on Pesticides. INCHEM [document online] 1980 [cited 26th May 2003]. Available from URL: www.inchem.org/documents/pds/pds/pest42_e.htm.
- [6] Ladrón de Guevara J, Moya Pueyo V. In: Ladrón de Guevara J, Moya Pueyo V (Eds.), Toxicología médica - clínica y laboral. New York: Interamericana McGraw-Hill; 1995, 459.
- [7] Gisbert Calabuig JA, Villanueva Cañadas E. In: Gisbert Calabuig JA (Ed.). Medicina legal y toxicología. 5th ed. Barcelona: Masson, SA; 1998, 806.
- [8] Food and Agricultural Organization. Dimethoate, Omethoate, and Formothion [document online] [cited 26th May 2003]. Available from URL: www.fao.org/docrep/W3727E/w3727e0g.htm.
- [9] Ecobichon DJ. In: Klaassen CD (Ed.). Casarett and Doull's Toxicology - the basic science of poisons. 5th ed. New York: McGraw-Hill; 1996, 643.
- [10] Ellenhorn MJ, Schonwald S, Ordog G, Wasserberger J. In: Ellenhorn MJ (Ed.). Ellenhorn's medical toxicology: Diagnosis and treatment of human poisoning. 2nd ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1997, 1614.
- [11] Repetto MR, Repetto M. Tabla de concentraciones de xenobióticos en fluidos biológicos humanos como referencia para el diagnóstico toxicológico (actualización 2005). In: Repetto M (Ed.). Área de Toxicología. Universidad de Sevilla. CD-Rom. Sevilla, 2005.
- [12] Kojima T, Yashiki M, Ohtani M, Chikasue F, Miyazaki T. Determination of dimethoate in blood and hemoperfusion cartridge following ingestion of formothion: a case study. Forensic Sci Int 1990; **48**: 79.

- [13] Pitarch E, López FJ, Serrano R, Hernández F. Multiresidue determination of organophosphorous and organochlorine pesticides in human biological fluids by capillary gas chromatography. *Fresenius J Anal Chem* 2001; **369**: 502.
- [14] Futagami K, Narazaki C, Kataoka Y, Shuto H, Oishi R. Application of high-performance thin-layer chromatography for the detection of organophosphorus insecticides in human serum after acute poisoning. *J Chromatogr B* 1997; **704**: 369.
- [15] Arthur CL, Pawliszyn J. *Anal. Chem.* 1990; **62**: 2145.
- [16] Barroso M, Gallardo E, Margalho C, Ávila S, Marques EP, Vieira DN, López-Rivadulla M. *J. Chromatogr. B* 2005; **816**: 29.
- [17] Lord HL, Pawliszyn J. *Anal. Chem.* 1997; **69**: 3899.
- [18] Myung SW, Min HK, Kim S, Kim M, Cho JB, Kim TJ. *J. Chromatogr. B* 1998; **716**: 359.
- [19] Bermejo AM, Seara R, Lucas ACS, Tabernero MJ, Fernández P, Marsili R. *J. Anal. Toxicol.* 2000; **24**: 66.
- [20] Musshoff F, Junker HP, Lachenmeier DW, Kroener L, Madea B. *J. Chromatogr. Sci.* 2002; **40**: 359.
- [21] Yuan H, Mester Z, Lord H, Pawliszyn J. *J. Anal. Toxicol.* 2000; **24**: 718.
- [22] Koster EHM, Wemes C, Morsink JB, Jong GJ. *J. Chromatogr. B* 2000; **739**: 175.
- [23] Musshoff F, Junker H, Madea B. *J. Chromatogr. Sci.* 2002; **40**: 29.
- [24] Dien K, Lentner C. *Tablas científicas*. Basel: Ciba-Geigy SA; 1975.
- [25] Ulrich S. *J. Chromatogr. A* 2000; **902**: 167.
- [26] Food and Drug Administration: U.S. Department of Health and Human Services, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. FDA [document online] [cited 21st January 2003]. Available from URL: www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf.
- [27] International Conference on Harmonization (ICH), Validation of Analytical Procedures: Methodology ICH Q2 B. ICH [document online] [cited 21st January 2003]. Available from URL: www.ich.org/MediaServer.jsr?@_ID=4188@_MODE=GLB.

Sample	Calibration	Linearity (n=7)	R ² values
	range (µg/mL)		
Blood	0.5 - 10.0	y=0.0043x+0.002	0.9996
	10.0 - 50.0	y=0.0043x-0.0027	0.9923
Urine	0.10 - 10.0	y=0.0046x+4E05	0.9994
	10.0 - 40.0	y=0.0052x-0.001	0.9957

Table 1. Validation data of calibration curve.

Sample	Recovery (%)	Concentration (µg/mL)	Intraday precision			Interday precision		
			Measured concentration (µg/mL)	C.V. (%)	Bias (%)	Measured concentration (µg/mL)	C.V. (%)	Bias (%)
Blood	0.50	0.5	0.51	7.25	2.74	0.47	9.97	-6.36
		5.0	4.70	5.89	-5.93	5.10	8.01	2.09
		10.0	10.65	6.45	6.49	9.53	12.55	-4.66
		25.0	21.68	5.77	-13.28	28.23	8.68	12.81
		50.0	49.87	11.52	-0.26	57.26	13.32	14.53
Urine	1.24	0.1	0.11	7.99	8.76	0.11	6.81	9.78
		0.5	0.49	11.08	-1.74	0.54	12.44	7.56
		2.5	2.64	6.24	5.54	2.66	4.36	6.39
		10.0	8.89	5.30	-11.43	9.31	9.13	-6.91
		40.0	40.1	3.88	0.22	40.9	10.13	2.47

Table 2. Precision, accuracy and recovery results.

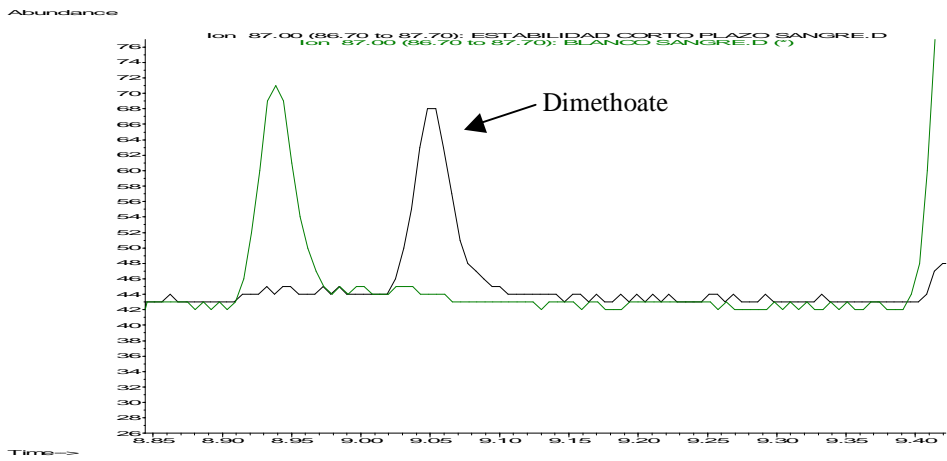


Figure 1. Merged fragmentograms (ion 87) obtained from a blood sample spiked with $1\mu\text{g}/\text{mL}$ of dimethoate, and from a blank sample.

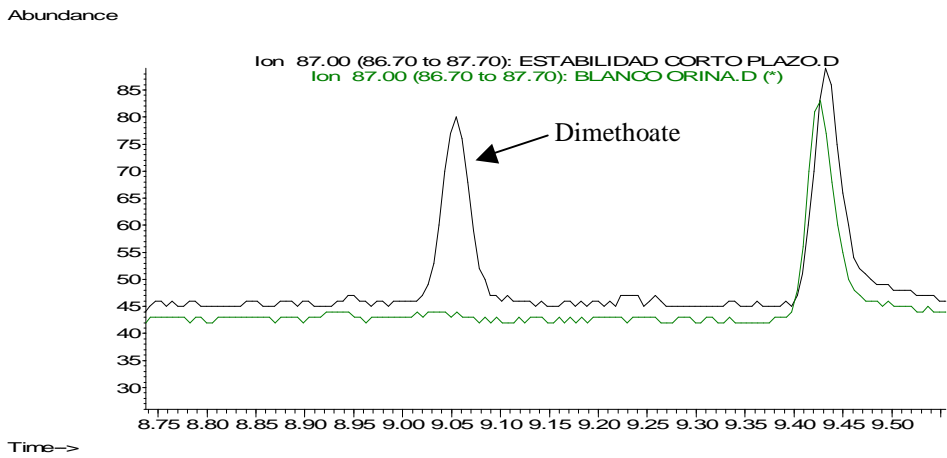


Figure 2. Merged fragmentograms (ion 87) obtained from an urine sample spiked with $0.25\mu\text{g}/\text{mL}$ of dimethoate, and from a blank sample.