

DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA POR GC-MS- μ ECD PARA A DETERMINAÇÃO DE INSETICIDAS ORGANOFOSFORADOS EM SANGUE TOTAL

Nuno Valente^{*1,2}, Sónia Tarelho^{1,3}, André Castro^{1,3}, Helena M. Teixeira^{1,3,4,5}, Armando Silvestre^{2,6}

OBJETIVOS & INTRODUÇÃO

Os pesticidas são substâncias destinadas a prevenir, destruir ou controlar pragas. No entanto, estes produtos são também responsáveis por intoxicações em seres humanos. Em Portugal, mais de metade das intoxicações voluntárias em humanos com pesticidas envolvem inseticidas organofosforados (IOFs).



Neste trabalho, pretendeu-se desenvolver e validar um conjunto de metodologias para a determinação analítica de dez IOFs, nomeadamente, clorfeninfos, clorpirifos, diazinão, dimetoato, fentão, fosadona, malatão, paratão, pirimifos-metilo e quinalfos, em amostras de sangue total, tendo em vista a introdução das mesmas na rotina pericial do Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (STF-N).

MATERIAL & MÉTODOS

✓ Extração em fase sólida (SPE):

Colunas	Sep-Pak [®] C18 (WATERS)
Preparação da amostra	0,5 mL Sangue total 5 mL Água destilada Centrifugar: 4000 rpm (30 min)
Condicionamento	2 mL Clorofórmio/2-propanol (9:1) 2 mL Acetonitrilo 2 mL Acetonitrilo/Água (1:1) 2 mL Água destilada
Retenção do analito	1-2 mL/min
Lavagem	10 mL Água destilada
Secagem	Vácuo (15 min)
Eluição	3 mL Clorofórmio/2-propanol (9:1)

✓ GC: Agilent 6890N



✓ MS: Agilent 5973N (com detetor do tipo quadrupolo)

✓ μ ECD: Agilent G2397A

RESULTADOS

TABELA 1. Parâmetros Analíticos dos sistemas de GC-MS e GC- μ ECD

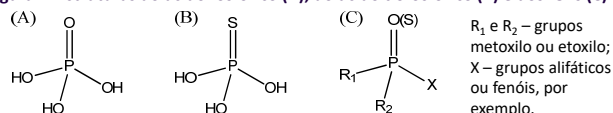
	Parâmetros	GC-MS	GC- μ ECD
Injetor	Temperatura	280 °C	280 °C
	Volume da amostra	2,0 μ L	1,0 μ L
	Modo de Injeção	Split (razão 38,5:1)	Splitless
Coluna	Modelo	HP-5ms Agilent 19091S-433	Varian Factor Four VF 5ms
	Características	30 m / 0,25 mm / 0,25 μ m	60 m / 0,32 mm / 0,25 μ m
	Gás de Arraste	Hélio	Hélio
	Caudal	1,3 mL/min (fluxo constante)	1,2 mL/min (fluxo constante)
Forno	Temperatura Inicial	80 °C (1,0 min)	80 °C (1,0 min)
	Rampa 1	35 °C/min (6,0 min)	20 °C/min (9,0 min)
	Rampa 2	10 °C/min (2,0 min)	10 °C/min (8,0 min)
	Temperatura Final	275 °C	275 °C
	Duração Programa	18,0 min	31,5 min
Detetor	Temp. Linha Transferência	280 °C	280 °C
	Temp. Quadrupolo	150 °C	-
	Temp. Fonte Ionização	250 °C	-
	Ionização	Impacto Eletrónico	-
	Modo de Aquisição	SIM	-
	Solvent Delay	5,0 min	-
	Temp. ECD	-	320 °C
	Gás de Make-up	-	Azoto (60 mL/min; fluxo constante)

TABELA 2. Parâmetros de Aquisição

Inseticidas	GC-MS		GC- μ ECD
	Tempos de retenção (min)	Iões Selecionados (m/z)	Tempos de retenção (min)
Dimetoato	5,95	87 ^(a) , 93, 125, 229	14,51
Diazinão	6,20	137, 153, 179, 304	14,68
Pirimifos-metilo	7,06	276, 290, 305	18,13
Malatão	7,16	127, 158, 173	18,77
Fentão	7,34	79, 153, 278	19,12
Clorpirifos	7,37	197, 286, 314	18,84
Paratão	7,38	139, 186, 235, 291	19,22
Clorfeninfos	7,78 e 8,01 ^(b)	267, 295, 323	20,10 e 20,57 ^(b)
Quinalfos	8,10	118, 146, 157, 298	20,69
Etião (PI)	10,47	153, 231	23,35
Fosadona	14,29	121, 154, 182, 367	26,75

(a) o ião sublinhado foi selecionado para quantificação; (b) os picos com os tempos de retenção de 8,01 e 20,57 minutos correspondem ao isómero Z, o mais abundante.

Figura 1. Estruturas do ácido fosfórico (A), do ácido tiosfosfórico (B) e dos IOFs (C)



✓ Sensibilidade do ECD

O detetor mostrou ser sensível a todos os compostos a concentrações abaixo de 50 ng/mL, com exceção do fentão (só foi detetado a concentrações acima de 5000 ng/mL, o limite superior da gama de trabalho definida) e do pirimifos-metilo (a partir de 500 ng/mL).

✓ Gama de trabalho e Linearidade

Foi estudada a gama de trabalho para todos os IOFs entre 50 e 5000 ng/mL, com exceção do pirimifos-metilo (entre 500 e 5000 ng/mL) e do fentão (não definida) por GC-ECD, conforme justificado anteriormente. Foram preparadas curvas de calibração para as gamas de trabalho selecionadas e, devido à inexistência de homocedasticidade, foi estudada a regressão linear ponderada. O fator que apresentou menor soma dos erros relativos percentuais

foi $1/x^2$ por GC- μ ECD e GC-MS, com exceção do pirimifos-metilo por GC-ECD ($1/y^2$). Foram ainda avaliados os fatores $1/x$, $1/x^{1/2}$, $1/y$ e $1/y^{1/2}$.

✓ Seletividade e Arrastamento

O método mostrou ser seletivo no isolamento dos inseticidas em amostras *postmortem*. Não se observaram fenómenos de arrastamento no limite superior da gama em estudo.

✓ Limite de Quantificação (LQ)

O LQ definido foi de 50 ng/mL para todos os inseticidas, à exceção do pirimifos-metilo por GC-ECD (500 ng/mL).

✓ Rendimento de Extração

Foram obtidos rendimentos de extração médios entre 72 e 102% (Tabela 3).

Tabela 3. Rendimentos médios de extração

Inseticidas	Rendimento Médio (%)
Clorfeninfos	85,58
Clorpirifos	74,17
Diazinão	89,63
Dimetoato	97,29
Fentão	72,32
Fosadona	76,76
Malatão	82,12
Paratão	80,86
Pirimifos-metilo	102,27
Quinalfos	80,96

DISCUSSÃO & CONCLUSÕES

Não foi encontrada na literatura a descrição da utilização de GC- μ ECD para a deteção de IOFs em amostras biológicas humanas, pelo que esta será a primeira descrição da utilização de um detetor de captura eletrónica em cromatografia gasosa na análise deste tipo de amostras.

A utilização de duas colunas de separação cromatográfica e de dois detetores, GC- μ ECD e GC-MS, permitiu a realização da análise de rastreio por GC-MS e de confirmação qualitativa por GC- μ ECD assegurando, deste modo, a existência de metodologias diferentes necessárias para a emissão de um resultado positivo. A quantificação é realizada por GC-MS.

A utilização de dois sistemas cromatográficos num mesmo equipamento permite também a economia de recursos e espaço no laboratório, e disponibilidade do operador.

A validação da metodologia por via de um processo integrado e contínuo, baseada em critérios bem definidos de controlo de qualidade interno, assegura, também, a adequabilidade dos métodos e a qualidade dos resultados obtidos.

²Departamento de Química, Universidade de Aveiro

³CENCIFOR – Centro de Ciências Forenses

⁴Faculdade de Medicina – Universidade do Porto

⁵Faculdade de Medicina – Universidade de Coimbra

⁶CICECO – Centro de Investigação em Materiais Cerâmicos e Compósitos

¹Serviço de Toxicologia Forense

Delegação do Norte – Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. PORTUGAL

