



---

**Universidad Miguel Hernández de Elche**

Facultad de Ciencias Experimentales. Grado en Biotecnología

Departamento de Biología Aplicada

Área de Toxicología

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**EXTRACCIÓN Y MEDIDA SIMULTÁNEA DE PARATIÉN, PARAOXÓN Y  
4-NITROFENOL POR GC/MS PARA ESTUDIOS DE  
BIOTRANSFORMACIÓN**

Presentado por

**Lara Romo Metola**

Dirigido por

**Eugenio Vilanova Gisbert**

Catedrático de Toxicología

Elche, Curso Académico 2014/2015

## **AGRADECIMIENTOS:**

Durante toda la elaboración de este Trabajo de Fin de Grado, han participado, de una manera u otra, diferentes personas, permitiendo que dicho Trabajo fuera posible, a todas ellas me gustaría dedicarles unas palabras de agradecimiento:

En primer lugar me gustaría agradecer su dedicación, trabajo y apoyo al director de mí Trabajo de Fin de Grado, Profesor Eugenio Vilanova Gisbert. Gracias por su ayuda, consejos y confianza durante todo el desarrollo de este trabajo.

Un agradecimiento a Eva del Río Pons por su colaboración en varios experimentos del Trabajo, así como su ayuda y apoyo durante todo el desarrollo.

También quería agradecer a todos los profesores e investigadores del laboratorio donde se ha llevado a cabo el Trabajo, gracias por sus consejos y su disponibilidad siempre que lo necesitaba.



<b>1. INTRODUCCIÓN (7)</b>	
1.1 LOS COMPUESTOS ORGANOFORFORADOS Y SUS METABOLITOS DE DEGRADACIÓN	7
1.1.1 Estructura química	7
1.1.2 Propiedades físico-químicas	7
1.1.3 Aplicaciones comerciales de los compuestos organofosforados	8
1.1.4 Toxicocinética y toxicodinámica de los compuestos organofosforados	8
1.1.5 Mecanismos moleculares de los efectos tóxicos de los OPs	9
1.2 LA TÉCNICA ANALÍTICA DE CROMATOGRAFÍA DE GASES	10
1.2.1 Posibilidades y ventajas de la cromatografía de gases	10
1.2.2 Componentes de los equipos de cromatografía de gases	12
1.2.3 Purga del septum y proceso de inyección	13
1.2.4 Detector de espectrometría de masas	14
<b>2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS (15)</b>	
2.1 ANTECEDENTES	15
2.2 OBJETIVOS	16
2.2.1 Objetivo general	16
2.2.2 Objetivos específicos	16
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS (17)</b>	
3.1 MATERIALES	17
3.1.1 Compuestos objeto de estudio	17
3.1.2 Otros reactivos	17
3.1.3 Disoluciones	18
3.1.4 Otras disoluciones	18
3.1.5 Instrumentos	18
3.1.6 Otros Materiales	18
3.2 MÉTODOS	19
3.2.1 Cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS)	19
3.2.2 Metodología de las pruebas de Extracción	20
3.2.3 Degradación de paraoxón con suero de conejo extrayendo y midiendo por GC-MS	20
3.2.4 Degradación de paraoxón y de paratión con suero de conejo midiendo colorimétricamente el pNP liberado	21
3.2.5 Metodología Prueba de degradación de paraoxón con suero de pollo midiendo colorimétricamente el pNP liberado	22
<b>4. RESULTADOS (23)</b>	
4.1 OPTIMIZACIÓN MÉTODO CROMATOGRÁFICO	23
4.1.1 Determinación del tiempo de purga	23
4.1.2 Determinación de temperatura inicial	24
4.1.3 Reproducibilidad a diferentes concentraciones	25
4.2 PRUEBAS DE EXTRACCIÓN	28

4.2.1	Resultados de prueba de extracción en presencia o no de HCl	28
4.2.2	Extracción a diferentes concentraciones de los analitos	28
4.3	EXPERIMENTOS DE DEGRADACIÓN	32
4.3.1	Degradación de paraoxón con suero de conejo midiendo el resultado por GC-MS.	32
4.3.2	Degradación de paraoxón y paratión con sueros de conejo y pollo, midiendo colorimétricamente el 4-nitrofenol formado	33
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN (35)</b>	
5.1	SOBRE LA OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO	35
5.2	SOBRE LOS EXPERIMENTOS DE EXTRACCIÓN	35
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA (37)</b>	
6.1	CONCLUSIONES	37
6.2	PROYECCIÓN FUTURA	37
<b>7.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS (38)</b>	



## RESUMEN

Los organofosforados de uso como insecticidas se comercializan en forma de tiofosfatos con un grupo P=S. En el organismo de insectos y vertebrados se pueden biotransformar con una reacción de “activación tóxica” consistente en una desulfuración oxidativa a oxofosfatos (P=O) que es el metabolito tóxico capaz de inhibir colinesterasas y otras esterasas. En la forma oxo” es también la forma más activa en reacciones de hidrólisis que son su mecanismo principal de detoxificación. El balance entre la formación del metabolito tóxico y su detoxificación se pretende estudiar en determinados modelos experimentales in vitro e in vivo. Para ello, en este trabajo se ha optimizado el método de detección y medida simultánea de compuestos modelo paratión, paraoxón y el producto de hidrólisis 4-nitrofenol, por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Se comprobaron parámetros previamente valorados en el laboratorio y se optimizó en detalles otros. Se establecieron condiciones óptimas de inyección sin división (“splitless”), tiempo de purga y temperatura inicial del gradiente de temperatura, medida en modo scan (espectro de masas completo) pero cuantificando con el ion selectivo  $m/z=139$ . Se estableció el acetato de etilo como disolvente de extracción y se valoró la eficacia de la extracción desde medios acuosos a diversas concentraciones de los analitos. Se hicieron ensayos en preparaciones tras ser sometidas el paraoxón y el paratión a biotransformación con suero de conejo y de pollo obtenidos comercialmente. Se obtuvieron extracciones de alrededor del 80-90% y una reproducibilidad aceptable. La metodología se considera apropiada para futuros estudios de biotransformación en modelos biológicos.

**Palabras clave:** Paratión, paraoxón, 4-nitrofenol, p-nitrofenol, organofosforados, extracción, cromatografía de gases, espectrometría de masas, GC-MS.

## ABSTRACT

The organophosphorus compounds used as insecticides are marketed in the form of thiophosphates with a group P=S. In the body of insects and vertebrates they can be biotransformed by a reaction of "toxic activation" based in an oxidative desulfurization producing an oxo-phosphate (P=O) which is the toxic metabolite able of inhibiting cholinesterase and other esterases. The "oxo" form is also the most active in reactions of hydrolysis, the main mechanism of detoxication. The balance between the formation of the toxic metabolite and its detoxication aims to be studied in experimental models in vitro and in vivo. In this work, the method for detection and simultaneous measurement of the model compounds parathion, paraoxon and the product of hydrolysis 4-nitrophenol, by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS) has been optimized. Some parameters previously evaluated in the lab have been checked and other optimized in detail.

It was stablished optimum injection condition without division ("splitless"), the purge time (0.75 min) and initial temperature (90 °C) of the temperature gradient, measuring in scan mode (full range of masses) but quantification with the selective ion  $m/z = 139$ . Ethylacetate was established as the solvent for extraction and the effectiveness of the extraction from aqueous media at different concentrations of the analytes was assessed and optimized, discarding the use of acid in the medium.

Preparations of paraoxon and parathion were treated for biotransformation with rabbit and chicken serum commercially obtained. Extractions of about 80-90% and acceptable reproducibility were obtained. The methodology is considered appropriate for future studies of biotransformation in biological models.

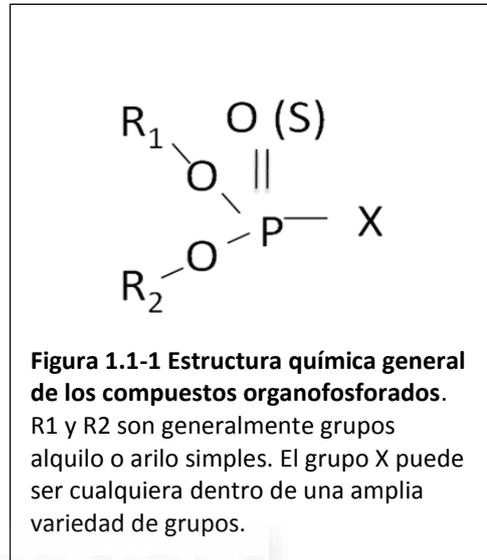
**Key words:** Paraoxon, parathion, 4-nitrophenol or p-nitrophenol, extraction, organophosphates, gas chromatography mass spectrometry, GC - MS.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 LOS COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS Y SUS METABOLITOS DE DEGRADACIÓN

### 1.1.1 Estructura química

La **Figura 1.1-1** muestra la estructura química general de los compuestos organofosforados (OPs). Dichos compuestos pueden ser tanto ésteres, amidas, o derivados tiólicos del ácido fosfórico o el ácido fosfónico. Normalmente R1 y R2 son grupos alquilo o arilo, pudiendo unirse de forma directa o a través de un átomo de oxígeno o azufre al fósforo central. Si R1 está unido directamente pero R2 a través de oxígeno, se denominan fosfonatos. En el caso de los fosforamidatos (o amidofosfatos), uno de los radicales debe de estar unido al átomo central de fósforo mediante un grupo -NR2.



En cuanto al grupo saliente, o grupo X, existe una gran variedad en cuanto a su estructura química, pudiendo estar formados por grupos aromáticos, heterocíclicos o alifáticos. En los llamados gases de guerra es habitualmente un átomo de flúor. En los insecticidas, el grupo X se une normalmente al fósforo mediante un enlace de oxígeno o azufre, y se libera de éste cuando el OP interacciona de forma covalente con una proteína diana o cuando el OP es hidrolizado por una fosfotriesterasa en una reacción de detoxicación, siendo éste el origen de su denominación de “grupo saliente”. Como se puede observar en la **Figura 1.1-1**, el átomo unido mediante un doble enlace al fósforo puede ser tanto un oxígeno como un azufre, lo que determinará que el OP resultante sea un fosfato o un fosfortioato, o también llamados oxo-fosfatos (como el paraoxón) o tiofosfatos como el paratión, respectivamente (WHO, 1986).

### 1.1.2 Propiedades físico-químicas

Los OPs son normalmente poco volátiles, sólidos o líquidos a temperatura ambiente. Por su carácter apolar son poco solubles en agua y solubles en disolventes apolares. En agua son poco estables y se hidrolizan fácilmente a pH<2 y especialmente en medio alcalino a pH>9. Se degradan en el medioambiente por hidrólisis tanto química como enzimática.

Su reactividad y propiedades toxicológicas se basan en la naturaleza electrofílica del centro del átomo de fósforo que propicia las sustituciones con reactivos nucleófilos. Estos pueden ser iones hidroxilo en agua (hidrólisis a pH alcalino), o en el centro activo de enzimas fosfotriesterasas

(destoxicación por hidrólisis enzimática con A-esterasas), o grupos hidroxilo (-OH) de residuo de serina del centro activo de B-esterasas (inhibición de B-esterasas).

### **1.1.3 Aplicaciones comerciales de los compuestos organofosforados**

Los OPs son ampliamente utilizados como plaguicidas, especialmente como insecticidas, y en menor medida como fungicidas, acaricidas y defoliantes. Se han utilizado ampliamente para control de insectos que actúan como vectores de enfermedades en humanos en áreas tropicales. El número de insecticidas organofosforados autorizados tanto para uso agrícola como para biocida de uso de interior, doméstico y en jardinería han disminuido en los últimos años.

Los OPs se han utilizado en aplicaciones industriales, como modificadores del plástico y aditivos del petróleo. Actualmente se producen OPs para los retardantes de llama en pinturas, textiles, materiales plásticos y materiales en construcción y en vehículos. Los OPs han tenido un uso terapéutico limitado, existiendo un tratamiento para el glaucoma basado en el organofosforado DFP, pero actualmente en desuso (Casida and Quistad, 2004).

Es motivo de alta preocupación, su fabricación como armas químicas, que se desarrollaron durante la Segunda Guerra Mundial, como son el gas sarín, el tabún y el somán, comúnmente conocidos como agentes nerviosos (Sato y Hosokawa, 2000), de los que permanecen miles de toneladas almacenadas y se considera un alto riesgo especialmente por su potencial uso terrorista.

### **1.1.4 Toxicocinética y toxicodinámica de los compuestos organofosforados**

Los aspectos generales más relevantes de la toxicocinética de OPs son (WHO., 1986):

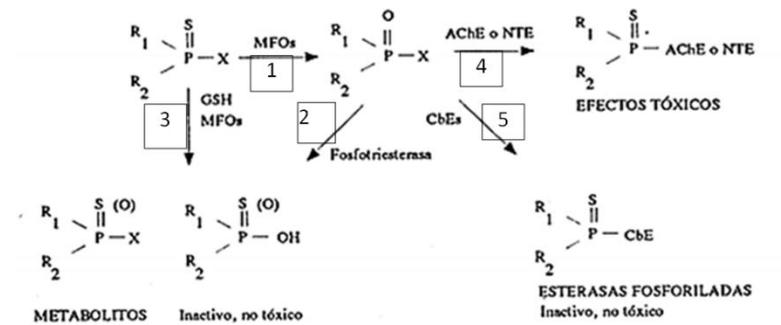
- Absorción: penetran las vías digestiva, respiratoria y cutánea, por su carácter lipofílico.
- Distribución: no se acumulan de manera significativa en ningún tejido del organismo, ya que son biotransformados de una manera muy eficaz en compuestos fácilmente eliminables por orina.
- Biotransformación: las principales reacciones son la desulfuración oxidativa ( $P = S \rightarrow P = O$ ) y la hidrólisis (ruptura de uno de los tres enlaces éster y liberación del grupo saliente).
- Eliminación: los OPs y sus productos de hidrólisis se eliminan de manera muy eficaz en orina.

Desde el punto de vista de su toxicidad los OPs pueden sufrir dos tipos de procesos metabólicos (WHO, 1986) y que representa en la **Figura 1.1-2**:

**Activación tóxica** mediante desulfuración oxidativa (reacción 1). Por ejemplo conversión de paratión en paraoxón que genera productos con mayor capacidad fosforilante capaz de producir efectos tóxicos por fosforilación de B-esterasas (reacción 4).

**Desactivación** mediante hidrólisis enzimática, que generan productos que no son capaces de fosforilar esterasas diana. Por ejemplo hidrólisis de paraoxón en ácido dietilfosfórico y p-nitrofenol (reacción 2) por fosfotriesterasas (A-esterasas) o la unión a B-esterasas (reacción 5).

El estudio de ambos procesos forma parte de la justificación del estudio presentado en esta memoria y que viene siendo objeto de estudio en el laboratorio de Toxicología, especialmente los procesos de desactivación por hidrólisis (Ver capítulo 2. Antecedentes y Objetivos).



**Figura 1.1-2.** Vías de activación tóxica y detoxificación de OPs.

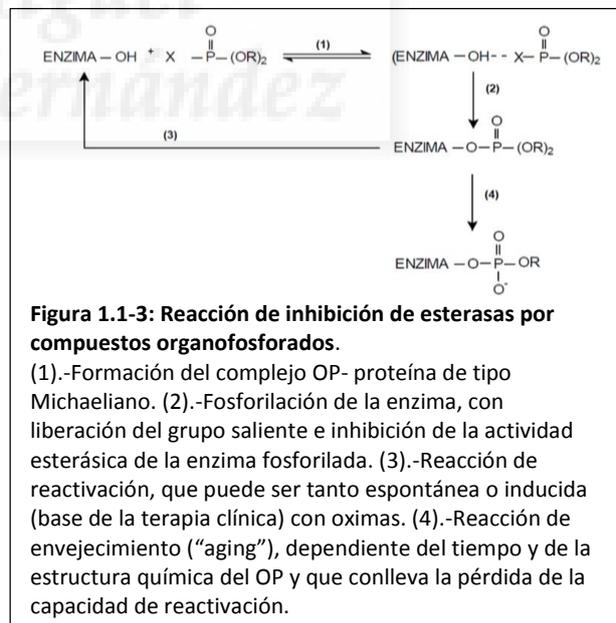
### 1.1.5 Mecanismos moleculares de los efectos tóxicos de los OPs

El principal efecto tóxico que presentan los OPs se debe a la fosforilación no reversible de esterasas del sistema nervioso central. Debido al carácter electrofílico del átomo de fósforo que les permite reaccionar con los grupos hidroxilo de los aminoácidos de serina, tirosina y treonina, produciéndose una fosforilación irreversible de dichos aminoácidos.

El mecanismo de fosforilación de enzimas esterasas por OPs se muestra en la **Figura 1.1-3**,

Existen diversas dianas de toxicidad conocidas,

pero también existen casos en los que no se conocen. La **Tabla 1.1-1** muestra los diferentes efectos neurológicos de los OPs así como las dianas y los síntomas.



La inhibición de AChE por fosforilación es el detonante de los efectos colinérgicos agudos, los mejor conocidos y estudiados de los OPs, y responsables de la actividad insecticida de los OPs. La inhibición

de la llamada esterasa diana de neuropatía (NTE) por OPs y su posterior envejecimiento (reacción 4 en Figura 2) es el desencadenante de un efecto neurodegenerativo. Sin embargo, los OPs interaccionan múltiples proteínas tipo esterasas y en el laboratorio de Toxicología se realiza una intensa actividad de búsqueda de nuevas dianas de la interacción con OPs (Mangas et al 2015, 2014; Benabent et al 2014; Estevez et al 2013, 2012, 2010; Garcia Perez et al 2003; Barril et al 1999) y de los efectos al desarrollo embrionario y la diferenciación celular (López Granero 2014, 2013) Romero et al 2015, 2011, Pamies et al, 2014; Sogorb 2014,2010; Estevan et al 2014.

De hecho, los efectos de los OPs sobre el sistema nervioso central tras exposición crónica suponen un problema de Salud Pública en el ámbito laboral y objeto de estudios (Granero et al. 2014)

Se ha descrito que la exposición a dosis repetidas de OP que no desencadenan toxicidad colinérgica pueden provocar a largo plazo efectos neurológicos y de comportamiento (Baltazar et al. 2014). La diana o dianas de estos efectos crónicos son desconocidas.

**Tabla 1.1-1** Toxicidad de los organofosforados relacionada con la inhibición de esterasas.

Efectos	Síntomas	Aparición sintomatología	Proteína implicada
Colinérgicos	<i>Muscarínicos</i> : broncoconstricción, vómitos... <i>Nicotínicos</i> : fatiga, temblor, debilidad muscular. <i>Derivados del SNC</i> : ansiedad, depresión respiratoria, confusión...	Inmediata	Acetilcolinesterasa
Síndrome intermedio	<i>Afección muscular</i> : parada respiratoria, debilidad muscular (cuello y extremidades)	24 – 96 h	Hiperestimulación de receptores nicotínicos
Neurotoxicidad retardada	<i>Afección motora</i> : debilidad muscular y parálisis flácida (zona distal extremidades inferiores).	2-3 semanas	NTE
Otros	<i>Otros síntomas (efector neurológicos de exposición a largo plazo, efectos al desarrollo embrionario, efectos al sistema retinoide)</i>	----	Otras no identificadas

## 1.2 LA TÉCNICA ANALÍTICA DE CROMATOGRAFÍA DE GASES

### 1.2.1 Posibilidades y ventajas de la cromatografía de gases

La cromatografía de gases es una técnica analítica basada en la separación de los analitos, en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. Se consigue una gran eficacia en la separación y control de todas las condiciones cromatográficas, lo que la convierte en unas de las técnicas cromatográficas más utilizada para fines analíticos.

La muestra se inyecta en una cámara de inyección y penetra en una corriente de un gas inerte, a alta temperatura, y la muestra se volatiliza.

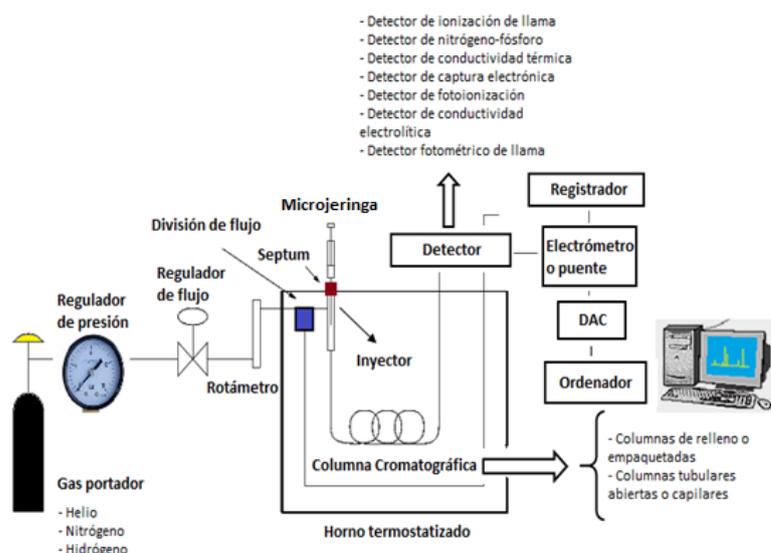
La corriente de gas posteriormente pasa por la columna cromatográfica, encargada de separar los componentes. Por último, los componentes que se han podido separar, salen de la columna a distintos intervalos, y pasan por un sistema de detección, que nos proporcionará los resultados de la separación cromatográfica.

La técnica destaca por su alta resolución, sensibilidad y velocidad, por lo que su uso está ampliamente extendido. Esta técnica también tiene limitaciones a la hora de analizar compuestos que se encuentren en su forma iónica, compuestos poco volátiles, compuestos que sean muy sensibles a cambios de temperatura, compuestos de elevada polaridad y compuestos de peso molecular superior a 600 u.m.a.

Un esquema general de un cromatógrafo de gases se muestra en la **Figura 1.2-1** y detalle del inyector en la **Figura 1.2-2**.

La técnica de cromatografía de gases está descrita ampliamente en textos de Química analítica instrumental (Sogorb y Vilanova 2003), en libros específicos (Valcarcel cases y Gomes Hens, 1988) o en tutoriales con fines docentes publicados por docentes de universidades, por ejemplo: Dario Cortes, 1998. También son de utilidad los propios manuales de los fabricantes de los equipos, en nuestro caso los manuales de uso del equipo Agilent GC 6890 y MS 7683 (Agilent 2001) han sido ampliamente usados como referencia operativa conceptual.

A continuación se describen brevemente los componentes más significativos de los equipos de cromatografía de gases que afectan a la optimización del método.



**Figura 1.2-1** Esquema de los componentes de un cromatógrafo de gases.

### **1.2.2 Componentes de los equipos de cromatografía de gases**

**Columnas:** Existen dos tipos diferenciados de columnas: (a) columnas de relleno o empaquetadas; (b) columnas tubulares abiertas o capilares. Estas últimas son las más utilizadas actualmente con diámetros entre 0,1 a 0,5 mm, siendo las más habituales las de 0,25 y 0,32 mm de diámetro interno-y de longitudes entre 10 y 50 metros. Consisten en un capilar normalmente de sílice fundida con un revestimiento interior que constituye la fase estacionaria con la que interaccionan los compuestos de la muestra reteniendo en mayor o menor grado en función de su afinidad, lo que condiciona la separación cromatográfica.

**Gas portador:** La elección de este gas viene determinado por el detector utilizado. Tiene dos funciones, a) transportar los componentes de la muestra, b) crear una matriz adecuada para el detector utilizado. El flujo, la velocidad y la presión deben ser controladas, tarea llevada a cabo por una serie de válvulas, que en los equipos actuales son controladas electrónicamente desde el software. Los gases portadores más utilizados son Nitrógeno, Hidrógeno y Helio. El helio es el gas portador que se usa en este trabajo y el habitual en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

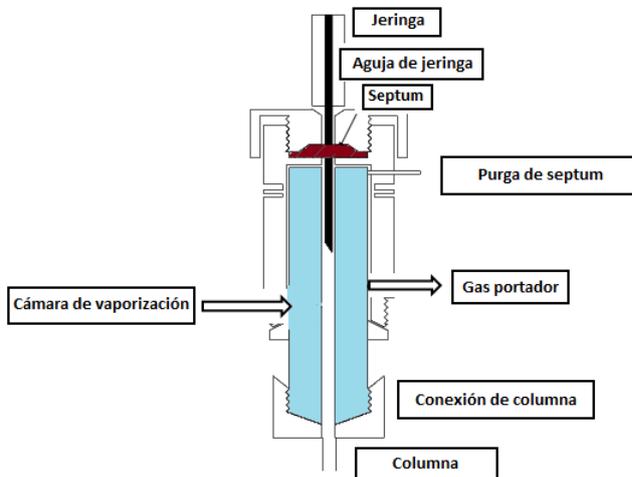
**Horno:** Tiene dos funciones, a) mantener la columna a una temperatura determinada, lo cual requiere una gran precisión, y b) cuando se quiere trabajar con temperaturas programadas con un gradiente a lo largo del tiempo del cromatógrafo, el control de la temperatura del horno, nos permite aumentar o disminuir la velocidad a una velocidad determinada y constante.

**Sistema de inyección:** Los Inyectores para columnas capilares trabajan de manera similar a los inyectores empleados en las columnas empaquetadas, pero los volúmenes a utilizar son mucho más bajos. Existen diversas técnicas de inyección para las columnas capilares siendo las de mayor relevancia las siguientes: (1) Inyección con división de muestra ("split"): el flujo de la muestra se divide y sólo entra una parte en la columna. La razón de "split" suele ser entre 1:5 a 1:100. (2) Inyección sin división ("splitless"); (3) Inyección en columna ("on column").

**Detectores:** Existen una gran variedad de detectores, entre los cuales destacan los siguientes: (1) ionización de llama; nitrógeno-fósforo; (3) conductividad térmica; (4) captura electrónica; (5) fotoionización; (6) conductividad electrolítica; (7) Detector fotométrico de llama; (8) espectrometría de masas. La detección por espectrometría de masas es la que se utiliza en este trabajo y ofrece la gran ventaja de ser universal (puede detectar todas las moléculas orgánicas), permite identificar de forma segura las sustancias por su espectro de masas, proporciona gran sensibilidad y especificidad

al poder eliminar posibles interferencias analizando los iones de masa específicos del espectro de la (s) sustancia(s) que se quieren analizar y cuantificar.

*Integrador-Ordenador:* Actualmente constan de un sistema informático junto al cromatógrafo que sirve para la toma y tratamiento de datos.



**Figura 1.2-2** Esquema del inyector de la cámara de inyección de un cromatógrafo de gases.

### 1.2.3 Purga del septum y proceso de inyección

El septum es un disco de goma que cierra la parte superior del inyector y a través del cual se pincha la jeringuilla que introduce la muestra en la cámara de inyección. Lo que se conoce como “la línea de la purga del septum” está próxima al septum donde la muestra se inyecta. Una pequeña cantidad de gas portador sale a través de esta línea para barrer cualquier sangrado. Cada inyector tiene un flujo de purga del septum diferente. El equipo que se utilizó en este trabajo fija automáticamente el flujo de purga que para para el gas helio es de 3 ml/min

Esto es especialmente importante cuando la neumática de inyector se trabaja en modo sin división (“splitless”). En este modo, la válvula de purga está cerrada durante la inyección y se mantiene así mientras la muestra se vaporiza en el alineador y es transferida a la columna. En un momento determinado después de la inyección, la válvula de purga se abre para eliminar cualquier vapor que permanezca en el alineador y por la válvula de división. Con esto se evitan las colas de disolvente debidas al gran volumen del inyector en comparación con la pequeña velocidad de flujo en columna. En el método de trabajo se debe especificar el tiempo y flujo de purga en la tabla de control del inyector y aunque el flujo se fija automáticamente si está indicado el gas portador. Si se está utilizando el ahorrador de gas, su tiempo debe establecerse después del tiempo de purga.

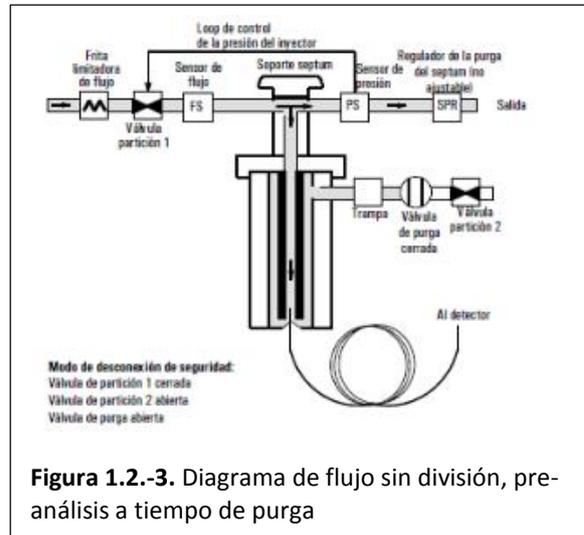
Un proceso de inyección sin división con éxito consiste en los siguientes pasos:

1. Vaporizar la muestra y disolvente en un inyector calentado.
2. Utilizar un flujo y una temperatura de horno bajos para crear una zona saturada de disolvente en la cabeza de la columna.
3. Utilizar esta zona para atrapar y reconcentrar la muestra en la cabeza de la columna.
4. Esperar hasta que toda, o al menos la mayoría,

de la muestra se haya transferido a la columna. Después, eliminar el vapor restante del inyector—que es mayoritariamente disolvente—abriendo la **válvula de purga**. Esto elimina la larga cola de disolvente.

5. Elevar la temperatura del horno para liberar de la columna el disolvente y después los analitos.

Se necesita realizar pruebas para mejorar las condiciones operativas.



**Figura 1.2.-3.** Diagrama de flujo sin división, pre-análisis a tiempo de purga

#### 1.2.4 *Detector de espectrometría de masas*

El detector de masa simple basado en un cuadrupolo y bombardeo electrónico es el usado en este trabajo. No se describen detalles de su funcionamiento puesto que optimización del mismo no ha sido objeto de este trabajo. Es relevante la posibilidad de trabajar en modo “Scan” en el que la muestra que sale de la columna se va haciendo espectros de masas cada pico tiempo (i.e: cada 0,3 seg) o modo SIM (se mide solo unos iones específicos de determinada relación masa/carga ( $m/z$ )). Este último modo permite mayor sensibilidad pero no nos da detalles de la identificación de sustancias que salen de la columna. Se puede trabajar en modo SCAN pero luego se puede analizar la información en base a un solo o varios iones específico, eliminando las interferencias de otras sustancias en el cromatograma. Este es el modo en que se ha trabajado en esta memoria.

## 2 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

### 2.1 ANTECEDENTES

En la Introducción se ha descrito cómo los organofosforados habitualmente se comercializan en forma de tiofosfatos, como el paratión. En el organismo tanto en los insectos como en los mamíferos pueden tener una reacción considerada de activación tóxica para formar la forma oxo, como por ejemplo el paraoxón. Este es considerado el metabolito tóxico responsable de su efecto insecticida pero es también la forma que es activa para reacciones de hidrólisis que son el mecanismo fundamental de detoxificación liberando dietilfosfato y 4-diclorofenol que se eliminan en orina.

El balance entre activación tóxica y detoxificación condiciona la toxicidad. En los insectos son muy activos en la reacción de activación tóxica y baja capacidad de detoxificación, aunque pueden adquirir resistencia por selección de individuos con mayor capacidad detoxificadora.

En el laboratorio se han realizado en pasado diversos estudios de biotransformación, especialmente en relación a los procesos de detoxificación por hidrólisis. Se ha estudiado la relación de paraoxonasa dependiente de calcio en tejidos humanos (Pellin et al 1990), la capacidad de albúmina en detoxificación de amidofosfatos (Sogorb et al 1998, 2007, 2008, 2010, Monroy et al 2007), la estereoespecificidad de la hidrólisis en tejidos mamíferos y suero humano (Monroy et al 2014). Se han realizado múltiples estudios de los procesos de cinética de interacción de organofosforados con B-esterasas (enzimas que se fosforilan por organofosforados (Mangas et al 2015, 2014, 2011; Benabent et al 2014; Estévez et al 2011, 2010, 2001; García Pérez et al 2001, 2003; Barril et al 1999)) como parte de sus mecanismos de toxicidad como en parte como mecanismo de detoxificación de los mismos.

El hígado en mamíferos es el órgano con mayor capacidad metabólica de activación tóxica pero también de mayor capacidad, junto a la sangre en enzimas capaces de su degradación por hidrólisis (fosfotriesterasas como paraoxonasa. En el ejemplo modelo del paratión, el paraoxón formado por activación tóxica se considera que solo puede llegar en concentraciones tóxicas al SN si las dosis son mayores que la capacidad de eliminación. Así pues la mayor parte de estudios de biotransformación se han centrado en hígado y en suero este último solo para reacciones de detoxificación por paraoxonasa porque los estudios in vitro muestran a esta enzima dependiente de calcio como la que le da la capacidad de detoxificación. Sin embargo en estudios del Prof Sogorb se ha demostrado que la albúmina de suero juega un papel crítico en la detoxificación en condiciones de ensayo más realistas a las condiciones in vivo (Sogorb et al 2007, 2010, 2014). Los modelos teóricos farmacocinéticos desarrollados consideran la capacidad metabólica del hígado y suero, mientras que el SN solo cómo el tejido diana del efecto tóxico

Por otro lado, en el laboratorio del Prof Vilanova se ha planteado la hipótesis de que aunque el SN tenga baja capacidad de activación tóxica (comparado con el hígado), esta puede ser crítica pues se produce in situ en el tejido diana y las concentraciones del metabolito tóxico formado son difícilmente eliminables porque su capacidad de destoxicación es a su vez muy baja.

Para ello, se plantea la necesidad de disponer de metodología eficaz para la extracción, detección y medida simultánea del compuesto parental, su metabolito tóxico y producto de hidrólisis, lo que es el objetivo de este trabajo que se describe a continuación

## **2.2 OBJETIVOS**

### **2.2.1 *Objetivo general***

El objetivo de este trabajo experimental fue establecer, validar y optimizar y comprobar su aplicabilidad del método óptimo en cromatografía de gases que permitiera detectar e identificar de forma inequívoca y cuantificar de manera más precisa y reproducible los paratión, paraoxón, y 4-nitrofenol a fin de poderlo aplicar al estudio de degradación del insecticida paratión en los que se pueda determinar simultáneamente el compuesto parental (paratión) y sus productos de biotransformación y activación tóxica (paraoxón) y el producto de degradación (4-nitrofenol).

Para ello, se ensayaron diferentes condiciones de dicha mezcla, distintos parámetros en la cromatografía de gases, las condiciones de preparación de los patrones y el método de extracción; se ensayó su utilización en experimentos interaccionando con suero de conejo, valorando la degradación de paraoxón por medio de la extracción y medida de paraoxón y el metabolito 4-nitrofenol por el método cromatográfico.

### **2.2.2 *Objetivos específicos***

1. Optimizar las condiciones para la separación y detección simultánea de paratión, paraoxón y 4-nitrofenol, por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), tanto las condiciones de inyección como las condiciones del gradiente de temperatura
2. Optimizar los iones de masa para la cuantificación en el detector de masas
3. Estudiar el proceso de extracción del paraoxón, paratión y 4-nitrofenol experimentando diferentes condiciones de extracción y midiendo los resultados de cada extracción empleando el método cromatográfico establecido.
4. Estudiar el comportamiento de paraoxón tratado con suero de conejo y suero de pollo en presencia de EDTA o  $\text{Ca}^+$  a distintos tiempos de reacción midiéndolo con el método cromatográfico establecido.
5. Evaluar el comportamiento de paratión tratado con suero de conejo, ensayando distintas concentraciones de EDTA y  $\text{Ca}^+$ .

## 3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 MATERIALES

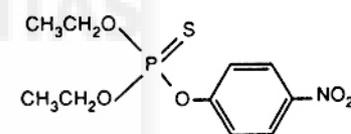
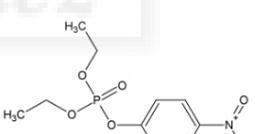
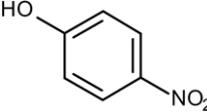
#### 3.1.1 Compuestos objeto de estudio

*Paratión* (O,O',S, dietil, S-nitrofenil tiofosfato), nombre IUPAC O,O-Dietil-O-4-nitro-feniltiofosfato, se obtuvo de PESTANAL (referencia 45607). En figuras y Tablas lo abreviamos como PTN.

*Paraoxón* (O,O',O" dietil O-nitrofenil fosfato), nombre IUPAC Dietil 4-nitrofenil fosfato, se obtuvo de Sigma-Aldrich España (referencia D9286). En figuras y Tablas lo abreviamos como PXN.

*4-Nitrofenol* (nombre IUPAC), se obtuvo de Sigma-Aldrich España (referencia 104-8). En figuras y Tablas lo abreviamos como pNP.

**Tabla 3.1-1.** Características de los compuestos objeto de estudio.

Nombre (abreviatura) (Nombre sistemático) [Num CAS]	Marca Referencia (Lote)	Características	Fórmula Molecular y Estructura
<b>Paratión (PTN)</b> (O,O',S, dietil, S-nitrofenil tiofosfato) [56-38-2]	PESTANAL 45607 (SZE7029X)	Insecticida organofosforado. Ejerce su acción a través de su metabolito oxidado (paraoxón). Actualmente no está en la lista de sustancias activas autorizadas Utilizándose en investigación como modelo de OP tipo tiofosfato.	<b>C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>5</sub>PS</b> 
<b>Paraoxón (PXN)</b> (O,O',O" dietil O-nitrofenil fosfato) [311-45-5]	SIGMA D9286 (095K1587)	Organofosforado potente inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa. Metabolito activo del insecticida paratión. Muy utilizado en investigación como modelo de OP activo, inhibidor de colinesterasas y otras esterasas.	<b>C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>1</sub>O<sub>6</sub>P<sub>1</sub></b> 
<b>4-Nitrofenol (pNP)</b> [100-02-7]	SIGMA 104-8 (4278X)	Compuesto fenólico. Producto de hidrólisis de paraoxón y otros nitrofenilfosfatos Puede irritar los ojos, la piel y las vías respiratorias e incluso. Al ingerir da lugar a vómitos y dolor abdominal.	<b>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>3</sub></b> 

#### 3.1.2 Otros reactivos

Otros reactivos generales (acetona, acetato de etilo, ácido clorhídrico) se obtuvieron de proveedores habituales en grado de pureza analítica.

Suero de conejo: se obtuvo comercialmente de SIGMA, Referencia R9133.

Suero de pollo: se obtuvo comercialmente de SIGMA, Referencia C5405.

### **3.1.3 Disoluciones**

*Paratión 10 mM*: Peso molecular: 291,26 mg/mmol. Densidad: 1,2659 g/ml. Se mezclaron 23,01  $\mu$ L de paratión y 9,977 ml de acetona.

*Paraoxón 10 mM*: Peso molecular: 275,195 g/mol. Densidad: 1,27 g/mL. Se pesaron 2,75 mg de paraoxón, se añadieron 10 ml de acetona seca hasta un volumen final de 10 ml.

*4-Nitrophenol 10 mM*: Peso molecular: 139,11 g/mol; Se pesaron 13,910 mg de 4-nitrophenol, se añadieron 10 ml de acetona.

*Disolución MIX* (paratión, paraoxón y 4-nitrophenol en acetona seca 2 mM):

- 1 ml de paratión 10 mM (preparada anteriormente)
- 1 ml de paraoxón 10 mM (preparada anteriormente)
- 1 ml de 4-nitrofenol 10 mM (preparada anteriormente)
- 2 ml de acetona seca

Se mezcló todo, obteniéndose 5 ml totales, con concentración 2 mM de cada compuesto.

### **3.1.4 Otras disoluciones**

Se utilizaron otras disoluciones preparados de acuerdo con el protocolo normalizado en el laboratorio: HCL 1 M; tampón TRIS (Tris (hidroximetil) aminometano) 50 mM en pH 8; Ca<sup>+</sup> 5 mM y EDTA (ácido etildiaminotetraacético) 5 mM, ambos en tampón TRIS 50 mM pH 8; tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4.

### **3.1.5 Instrumentos**

Para realizar todas las medidas cromatográficas de las muestras utilizamos un equipo de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), obtenido de Agilent Technology (España), producido en EEUU, compuesto por: Cromatógrafo 6890 N Network GC System (G1530 N) detector de masas, modelo Agilent 5973 Network Mass Selective Detector, inyector automático modelo 7683 series, y bomba de vacío. La alimentación de gas helio fue a través de una instalación fija en el laboratorio y el gas en cilindros de presión de Praxair SA (España) (Helio extrajeno XXX).

Para medir colorimétricamente el pNP liberado por la degradación de paraoxón y de paratión utilizamos un lector de placas: Beckamn Coulter<sup>tm</sup> AD 340 y utilizamos un baño termostaticado a 37°C.

En los ensayos de extracción se utilizaron los siguientes equipos: centrífuga: MIXTASEL-BL P Selecta; volteador (agitador rotativo); Agitador vórtex.

### **3.1.6 Otros materiales**

Otros materiales utilizados fueron los siguientes: Micropipetas (P10, P20, P200, P1000, P5000); Micropipeta Multicanal de 250 µl; Puntas de Micropipetas; Tubos de ensayo; Gradilla; Varilla; Frasco Lavador; Viales; Pinzas; Soporte; Gotero; Tubos de centrifuga; matraz Erlenmeyer; Probeta graduada; Pipeta graduada; Vasos de precipitado; Matraz Volumétrico; otros.

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1 Cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS)**

Se utilizó un equipo de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), obtenido de Agilent Technology (España), compuesto por: Cromatógrafo 6890 N Network GC System (G1530 N) detector de masas modelo Agilent 5973 Network Mass Selective Detector, inyector automático modelo 7683 series, y bomba de vacío. La alimentación de gas helio fue a través de una instalación fija en el laboratorio y el gas en cilindros de presión de Praxair SA (España) (Helio extrajeno XXX).

La optimización del método analítico forma parte de los objetivos de este trabajo. Para ello se realizaron diversos experimentos variando parámetros de método cromatográfico y de detección por masas que se describen en Resultados. Se describe a continuación las condiciones del método optimizado utilizado en experimentos posteriores.

El nivel más bajo de masas establecido que el método puede detectar es de 40, mientras que el nivel de más alto es de 300, el Threshold (señal mínima que reporta) quedó establecido en 150.

En cuanto a lo referido a las temperaturas utilizadas, se estableció que la máxima temperatura del horno fuera de 325°C y el tiempo de equilibrado de 0,50 min. En cuanto a la temperatura del MSD, la temperatura del cuadrupolo quedó establecida en 150°C, mientras que la temperatura de la fuente de iones del detector de masas en 230°C. Por otra parte la temperatura inicial del Inlet se estableció en 250°C y su presión en 92.176 Kpa, mientras que el canal auxiliar de tipo MSD se fijó en 280°C.

En cuanto al gradiente de temperaturas que sigue el método, comienza con una temperatura de 90°C durante 1 min, posteriormente se produce una subida de temperatura hasta los 160°C (0 min) a 20°C/min, a continuación tiene lugar otra subida de temperatura hasta los 260°C (0 min) mediante 10°C por minuto, y finalmente, se produce una última subida de temperatura hasta una temperatura final de 280°C a 20°C/min, en esta temperatura final el sistema permanece 1 minuto.

El tiempo de purga establecido fue de 0,75 segundos, el flujo de purga se implantó en 15 ml/min. Se decidió usar en modo splitless (inyección sin división). Se decidió establecer gas ahorro (gas sabe), el

cual tenía un tiempo de 2 min y un flujo de 20 ml/min. Con respecto al gas portador, en este caso helio, el flujo se fijó en 1,3 ml/min. En cuanto a la inyección, el volumen se estableció en 3  $\mu$ l, y el tamaño de jeringa de 10  $\mu$ l, además, a la hora de inyectar se producen 2 lavados de la jeringa con el disolvente, seguido de 1 lavado de la muestra, 6 bombeos en la muestra para posteriormente tomar 3  $\mu$ l que serán los que se inyectaran en la jeringa. El tiempo de “solvente delay” se fijó en 3 min. Por último, la columna utilizada de la marca Phenomenex con número de serie 195243, ZB-MultiResidue-1, es de 30 metros de longitud, con un diámetro interno de 0,25 mm, y una película interna (fase estacionaria) de 0,25  $\mu$ m.

### **3.2.2 Metodología de las pruebas de Extracción**

A lo largo de todo el trabajo experimental, se llevaron a cabo distintas pruebas de extracción en las cuales se prepararon distintos tubos controles en algunos casos por duplicado y en otras no. A estos tubos se añadió el respectivo volumen de acetato de etilo, para finalmente conseguir tubos controles con concentraciones de la Disolución MIX entre un rango de 0  $\mu$ l a 100  $\mu$ l (0, 5, 10, 20, 50 y 100).

Por otra parte, los tubos etiquetados como muestra (tipo A) se prepararon siguiendo los mismos pasos, para finalmente disponer de tubos muestra con el mismo rango de concentraciones de la Disolución MIX que los tubos controles. A estos tubos muestra se les añadió 2000  $\mu$ l de PBS y por último 2000  $\mu$ l de acetato de etilo. En una de las extracciones, además, se añadió una variable más puesto que se prepararon muestras de tipo B, a las cuales, aparte de contener los mismos volúmenes y reactivos que las muestras del tipo A contenían también 50  $\mu$ l de ácido clorhídrico.

Una vez preparados todos los tubos de cada extracción el procedimiento por el cual se traspasó la parte a medir a cada vial fue el mismo en todos los casos.

Todos los tubos preparados se pusieron en el volteador durante dos horas, con el objetivo de que todos los componentes se mezclaran correctamente, además se pasaron por un proceso de centrifugación de 1000 rpm durante 10 minutos, para conseguir las dos fases bien definidas.

Por último, ya con las dos fases separadas, se tomó 1 ml de cada tubo, de la fase orgánica (arriba) porque el acetato de etilo es menos denso que el agua, y se introduzco en viales, preparados para ser medidos en la Cromatografía de Gases.

### **3.2.3 Degradación de paraoxón con suero de conejo extrayendo y midiendo por GC-MS**

En estos experimentos se evaluó la degradación del paraoxón según distintas condiciones. Se prepararon diferentes tubos empleando distintas concentraciones de EDTA 5 mM y de  $\text{Ca}^{2+}$  5 mM, así como distintas concentraciones de suero de conejo.

Durante todo el experimento, los tubos estuvieron en un baño termostatzado a 37°C, para que la reacción ocurriera correctamente. Los intervalos fueron de 40 segundos tanto para el PXN como para el HCL. Una vez preparados todos los tubos, se pusieron en el volteador, posteriormente se introdujeron en la centrífuga 1000 rpm durante 3 minutos, y por último, una vez las fases separadas, se pasó 1 ml de fase orgánica a cada vial para poder medir en el cromatógrafo de gases.

Este experimento se realizó con un tiempo de reacción de 30 minutos.

La secuencia, volúmenes empleados en cada tubo y tiempos del experimento se muestran en la **Tabla 3.2-1**.

**Tabla 3.2-1. Degradación de paraoxón con suero de conejo extrayendo.** Secuencia, tiempos y volúmenes ( $\mu\text{L}$ ) del experimento.

Código Muestra	TRIS ( $\mu\text{L}$ )	Ca <sup>2+</sup> ( $\mu\text{L}$ )	EDTA ( $\mu\text{L}$ )	Suero conejo ( $\mu\text{L}$ )	PXN ( $\mu\text{L}$ )	t (min)	HCl ( $\mu\text{L}$ )	t (min)	Acetato de etilo ( $\mu\text{L}$ )	t (min)
C1	500		1000		500	0	100	0	2000	0
C2	500	1000			500	0,75	100	0,75	2000	0,75
EDTA 10	490		1000	10	500	1,20	100	1,20	2000	1,20
Ca 10	490	1000		10	500	2	100	2	2000	2
EDTA 30	470		1000	30	500	2,40	100	2,40	2000	2,40
Ca 30	470	1000		30	500	3,20	100	3,20	2000	3,20
EDTA 100	400		1000	100	500	4	100	4	2000	4
Ca 100	400	1000		100	500	4,40	100	4,40	2000	4,40
B11	1900			100		5,20	100	5,20	2000	5,20
B12	2000					6	100	6	2000	6

### 3.2.4 Degradación de paraoxón y de paratión con suero de conejo midiendo colorimétricamente el pNP liberado

En este experimento se utilizaron distintas disoluciones. TRIS 50 mM pH 8; Ca<sup>2+</sup> 5 mM en TRIS; EDTA 5 mM en TRIS; suero de conejo; paraoxón 4 Mm en TRIS.

Los volúmenes se muestran en la **Tabla 3.2-2** para el paraoxón y en la **Tabla 3.2.3** para el paratión.

**Tabla 3.2-2. Experimento de degradación de paraoxón (PXN) con suero de conejo.** Volúmenes ( $\mu\text{L}$ ) preparados para cada tubo.

Código muestra	Ca <sup>2+</sup> 5 mM ( $\mu\text{L}$ )	EDTA 5 mM ( $\mu\text{L}$ )	Suero conejo ( $\mu\text{L}$ )	tampón TRIS ( $\mu\text{L}$ )	PXN ( $\mu\text{L}$ )
C1 (control)	-	500	-	250	250
C2 (control)	500	-	-	250	250
B11 (blanco)	-	-	15	975	-
B12 (blanco)	-	-	-	1000	-
EDTA 10	-	500	5	245	250

<b>Ca<sup>+</sup> 10</b>	500	-	5	245	250
<b>EDTA 30</b>	-	500	15	235	250
<b>Ca<sup>+</sup> 30</b>	500	-	15	235	250

**Tabla 3.2-3. Experimento de degradación de paratión (PTN) con suero de conejo.** Volúmenes ( $\mu$ l) preparados para cada tubo.

<b>Código muestra</b>	<b>Ca<sup>2+</sup> 5 mM (<math>\mu</math>l)</b>	<b>EDTA 5 mM (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Suero conejo (<math>\mu</math>l)</b>	<b>tampón TRIS (<math>\mu</math>l)</b>	<b>PXN (<math>\mu</math>l)</b>
<b>C1 (control)</b>	-	500	-	250	250
<b>C2 (control)</b>	500	-	-	250	250
<b>BI1 (blanco)</b>	-	-	50	950	-
<b>BI2 (blanco)</b>	-	-	-	1000	-
<b>EDTA 30</b>	-	500	15	235	250
<b>Ca<sup>+</sup> 30</b>	500	-	15	235	250
<b>EDTA 100</b>	-	500	50	200	250
<b>Ca<sup>+</sup> 100</b>	500	-	50	200	250

En microtubos de 1'5 ml se añadió el volumen correspondiente de tampón TRIS, se añadió Ca<sup>2+</sup> 5 mM o EDTA 5 mM en los tubos pertinentes y el volumen de suero indicado. A continuación se añadieron 250  $\mu$ l de paraoxón 4 mM y se incubó durante 15, 30, 45, 60 o 90 min. Inmediatamente después de este tiempo, se midió la absorbancia a 400 nm.

Los ensayos se realizaron por duplicado. Considerando tiempo cero el momento de añadir paraoxón al primer tubo, los tiempos en los cuales se añadió paraoxón en los Replicados 1 fueron a los 0, 30, 45, 60 y 75 min y se midió la absorbancia a 400 nm a los 90 min. Por lo que, el paraoxón estuvo actuando diferentes tiempos en cada tubo, en el primero 90 min, en el segundo 60 min, en el tercero 45 min, en el cuarto 30 min y en el último 15 min. Por otra parte, en los Replicados 2, los tiempos en los que se añadió el paraoxón fueron a los 6 min, 36 min, 51 min, 66 min, 81 min y se midió la absorbancia a 400 nM a los 96 min.

### **3.2.5 Metodología Prueba de degradación de paraoxón con suero de pollo midiendo coloriméricamente el pNP liberado**

En este experimento con suero de pollo, se utilizó los mismos componentes y procedimiento utilizado en el experimento con suero de conejo. Los tiempos también fueron los mismos.

Los volúmenes de los reactivos se muestran en la **Tabla 3.2-4**.

**Tabla 3.2-4. Experimento de degradación de paraoxón (PXN) con suero de pollo.** Los Volúmenes ( $\mu\text{l}$ ) preparados para cada tubo.

Código muestra	Ca <sup>2+</sup> 5 mM ( $\mu\text{l}$ )	EDTA 5 mM ( $\mu\text{l}$ )	Suero de pollo ( $\mu\text{l}$ )	tampón TRIS ( $\mu\text{l}$ )	PXN 4 mM ( $\mu\text{l}$ )
C1 (control)	-	500	-	250	250
C2 (control)	500	-	-	250	250
BI1 (blanco)	-	-	50	950	-
BI2 (blanco)	-	-	-	1000	-
EDTA 100	-	500	50	200	250
Ca <sup>+</sup> 100	500	-	50	200	250

## 4 RESULTADOS

### 4.1. OPTIMIZACIÓN MÉTODO CROMATOGRÁFICO

En el laboratorio se habían valorado anteriormente diversos parámetros del sistema cromatográfico, incluyendo tipo de columna, condiciones de inyección con o sin división (“split/splitless”) y razón de Split y tipo de alineador del inyector, gradiente de temperaturas del horno, temperatura del inyector, flujo de gas (y presión en columna), flujo de gas ahorrador y condiciones de trabajo del detector de masas. Estos parámetros se comprobaron y revisaron de nuevo, pero en esta Memoria no se presentan datos de esta actividad.

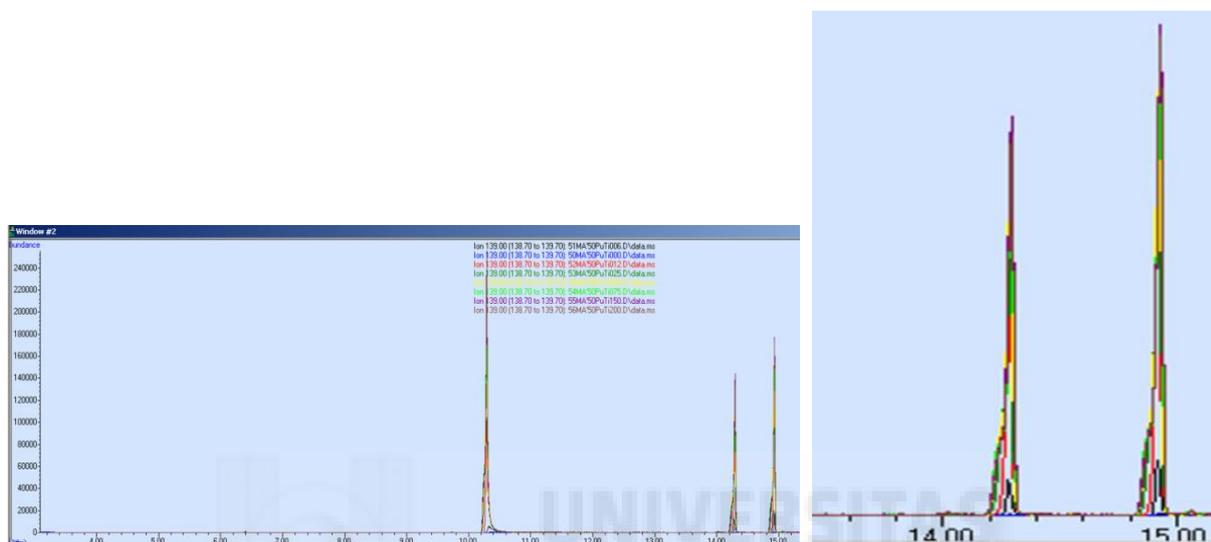
A continuación se presentan los datos de la optimización de los parámetros que no habían sido optimizados previamente, específicamente del tiempo de purga de gas en el inyector y temperatura inicial del gradiente de temperatura del horno.

#### 4.1.1 Determinación del Tiempo de Purga

Con el propósito de averiguar el tiempo de purga más apropiado a emplear en el método cromatográfico, se hicieron distintas medidas utilizando la disolución MIX (mezcla de paraoxón, paratión y 4-nitrofenol), se fue variando dicho parámetro, sin cambiar ningún otro.

Se seleccionó el ión  $m/z = 139$  que permitió que apareciera en los resultados los tres compuestos (PXN, PTN y pNP) y se comprobando tiempos de purga desde el 0 segundos a 2 min (**Figura 4.1-1** (panel A) y ampliación en la **Figura 4.1-1** (panel B)).

Tiempos de purga <0'06 min (pico de color negro 6 segundos y pico de color rojo 12 segundos), los picos son más pequeños y anchos. Mientras que en los picos con un tiempo de purga mayor, los picos cromatográficos son mucho más estrechos y muestran una mayor abundancia, lo cual se traduce en una mayor sensibilidad y resolución. A la vista de los resultados, se decidió emplear un tiempo de purga de 0'75 min (pico verde claro), el cual ofrecía buenos resultados con picos cromatográficos estrechos y bien definidos.



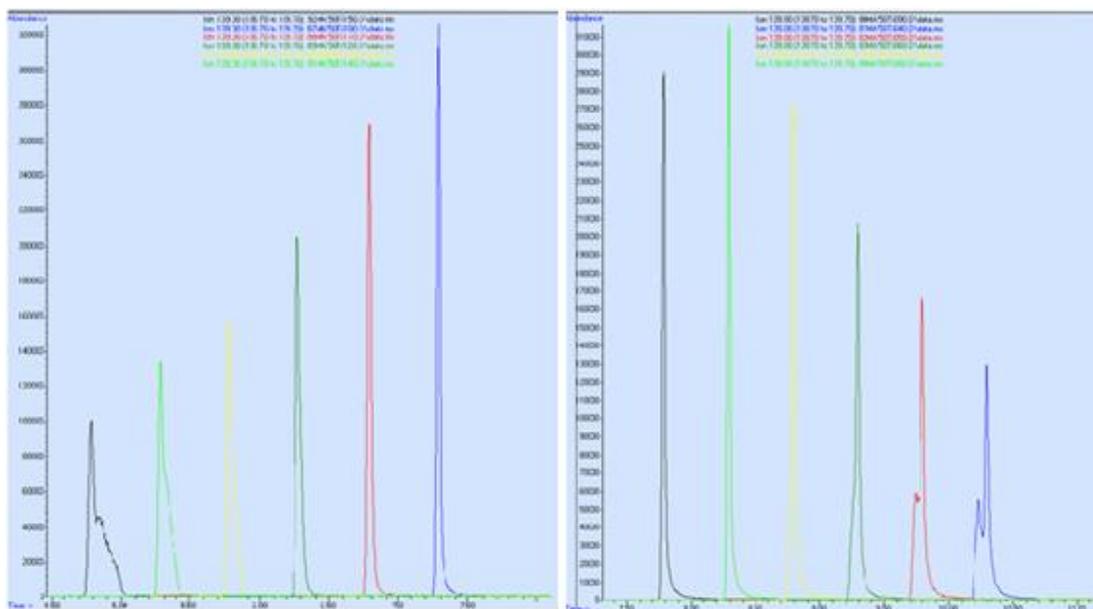
**Figura 4.1-1. Cromatogramas superpuestos cambiando el tiempo de purga, desde 0 segundos a 200 segundos (panel izquierdo (A)).** Se muestra la señal seleccionada del  $m/z= 139$ . El panel derecho (B) es una imagen ampliada de los picos de paratión y paraoxón.

#### 4.1.2 Determinación de la temperatura Inicial

Otro parámetro importante a modificar para poder obtener mejores resultados fue la temperatura inicial del método cromatográfico, es decir, a qué temperatura tiene comienzo el programa de gradiente de temperatura. Se midió la disolución MIX, ensayando distintos valores de temperatura inicial sin cambiar ningún, otro parámetro.

En la **Figura 4.1-2** en el panel derecho, donde se seleccionó el ión  $m/z= 139$ , se puede apreciar que a medida que la temperatura inicial disminuye se obtienen picos cromatográficos anchos, menos definidos, aparecen “codos”, y además dichos picos aparecen a tiempos mayores y presentan una menor abundancia. Con temperaturas iniciales mayores, 70°C, 80°C Y 90°C, la resolución y sensibilidad son mayores.

Por otro lado, en la **Figura 4.1-2** en el panel de la izquierda se puede percibir, que a temperaturas con valores mucho más elevados (pico de color negro 150°C), los resultados también empiezan a empeorar, de nuevo con picos anchos y poco definidos. A la vista de los resultados, determinamos la temperatura inicial óptima de 90°C.



**Figura 4.1-2. Cromatogramas con diferente temperatura inicial.** Superposición de cromatogramas, mostrando el pico del 4-nitrofenol para diferentes temperaturas iniciales del gradiente de temperatura del horno para temperaturas de 150, 140, 130, 120, 110 y 100 (panel izquierdo) y de 90, 80, 70, 60, 50 y 40 (panel derecho), Se muestra la señal seleccionada del  $m/z=139$  en las condiciones cromatográficas indicadas en Materiales y Métodos, excepto la temperatura inicial del gradiente de temperaturas.

#### 4.1.3 Reproducibilidad a diferentes concentraciones

Con la finalidad de averiguar si el método elegido presentaba una correcta reproducibilidad en los replicados a diferentes concentraciones, se efectuaron diferentes experimentos. Para estas pruebas se utilizaron y midieron los viales preparados en la extracción a diferentes concentraciones de los analitos (metodología explicada en el apartado de Materiales y Métodos).

En la **Figura 4.1-3** se midió los viales preparados de unas muestras reales de un experimento de extracción utilizando el método óptimo ya determinado, por lo que se puede apreciar, como varían los resultados según la concentración de MIX utilizada. El intervalo de concentraciones va desde 5  $\mu\text{L}$  de MIX hasta 100  $\mu\text{L}$  de MIX. Se puede percibir que los resultados varían según la concentración, puesto que con la concentración más baja utilizada (5  $\mu\text{L}$  de MIX), aparecen picos más anchos y con menor abundancia, además la figura 4 presenta al final de la imagen ruido de fondo, lo cual distorsiona los resultados.

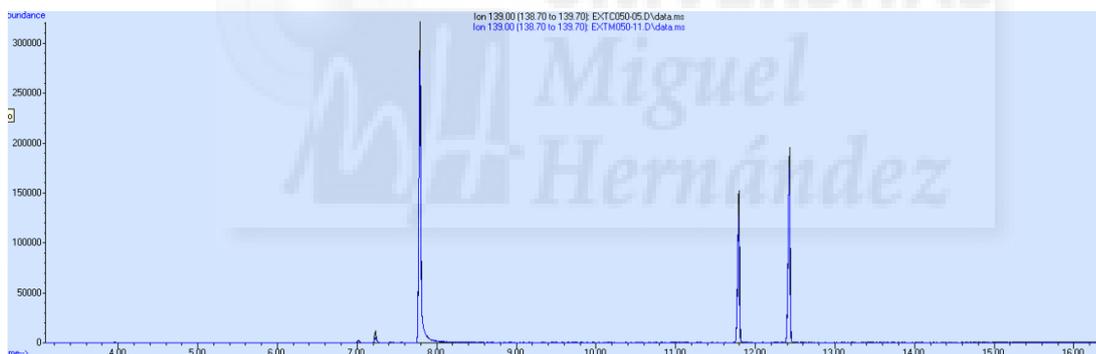


**Figura 4.1-3. Cromatogramas de muestras de experimentos de extracción.** Se prepararon muestras en 2 ml medio acuoso conteniendo 5, 10, 20, 50 o 100  $\mu$ l de disolución MIX. Se extrajeron con 2 ml de acetato de etilo según el procedimiento detallado en Materiales y Métodos. Se muestran los cromatogramas correspondientes de menor a mayor concentración.

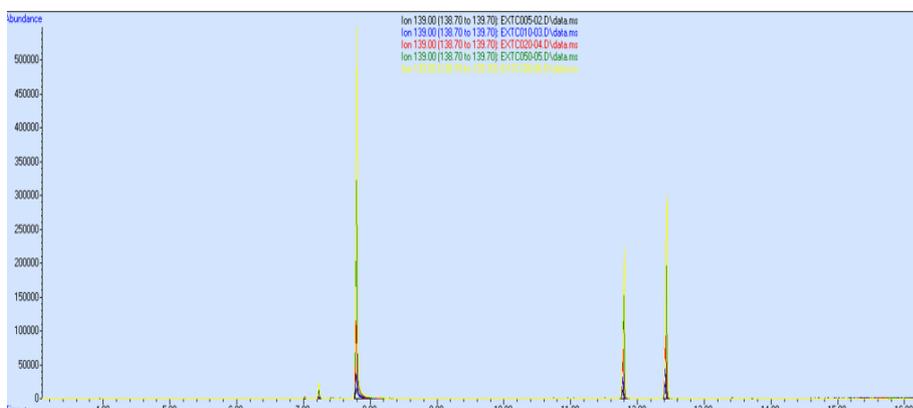
A medida que la concentración va aumentando, este ruido de fondo va desapareciendo, por otra parte, los picos se van estrechando y van aumentando su abundancia. Aunque se ha de decir, que aún utilizando concentraciones tan bajas como 5  $\mu\text{L}$  de MIX, se pueden diferenciar ya claramente los tres compuestos y que, a partir de 20  $\mu\text{L}$  los resultados son muy buenos, sin ruido de fondo y con picos muy bien definidos.

Para poder ver si los resultados de los viales duplicados con la misma concentración eran parecidos, es decir, si existía reproducibilidad en el método, se superponieron los resultados. Como se ve en la **Figura 4.1-4**, el cromatograma al seleccionar el ión  $m/z=139$  es prácticamente igual en el tubo duplicado de 20  $\mu\text{L}$  de MIX (picos negros corresponden al tubo normal y picos azules corresponde al tubo duplicado). Por lo que se mantenía la reproducibilidad en los resultados. Hecho que se repetía con las concentraciones restantes.

Además en la **Figura 4.1-5** se observa la reproducibilidad del método con respecto a la variación de concentraciones, puesto que en todas las concentraciones los picos aparecen al mismo tiempo, aunque variando su abundancia, como cabría esperar, puesto que presentan distintas concentraciones de la disolución MIX.



**Figura 4.1-4. Comparación en imágenes superpuestas de los replicados de concentración.** Muestras con 20  $\mu\text{L}$  de MIX. Se muestra la señal seleccionada del  $m/z=139$ .



**Figura 4.1-5. Muestras con 5, 10, 20, 50 y 100  $\mu\text{L}$  de MIX comparación en imágenes superpuestas.** Se muestra la señal seleccionada del  $m/z=139$ .

## 4.2. PRUEBAS DE EXTRACCIÓN

### 4.2.1. Resultados de la Prueba de Extracción en presencia o no de HCl

Se prepararon diferentes muestras de 2 ml la mezcla de paratión, paraoxón y 4-nitrofenol en medio acuoso en tampón Tris 50 mM pH 8, siguiendo la metodología explicada en el apartado de Métodos. Se ensayaron dos condiciones diferentes: Extracción en ausencia (A) o en presencia (B) de HCl. A continuación se realizó la extracción con 2 ml de acetato de etilo, un volumen 1 ml de la fase orgánica se colocó en un vial. Una vez listos todos los viales del experimento, se procedió a medir por cromatografía de gases y espectrometría de masas. Se prepararon controles consistentes en disolución en acetato de etilo a la concentración esperable si la extracción fuese del 100%. Se calculó el porcentaje de extracción comparando los extractos de las muestras con las disoluciones controles. Los resultados se muestran en la **Tabla 4.2-1**. Como se observa el procedimiento B dio lugar a porcentajes de extracción mucho menores que el procedimiento A.

**Tabla 4.2-1. Porcentajes de extracción en presencia o no de HCl.** con muestras de concentraciones 100  $\mu$ M extraídas con acetato de etilo por los procedimientos A o B, respectivamente.

Método	4-nitrofenol (tR=7,316 min)	paraoxon (tR=11,653 min)	paratión (tR=12,316 min)
A	78,8%	80,4%	86,6%
A	81,6%	80,4%	82,2%
B	37,2%	13,6%	46,1%

### 4.2.2. Extracción a diferentes concentraciones de los analitos

Se decidió realizar una nueva extracción, aumentando el rango de concentraciones de la Disolución MIX. Siguiendo la misma metodología ya explicada en el apartado Métodos, se prepararon diferentes tubos cuyos volúmenes se pueden observar en las **Tablas 4.2-2 y 4.2-3** Los resultados obtenidos se pueden observar en la **Tabla 4.2-4**.

Una vez obtenidos estos resultados, se procedió a calcular los porcentajes de extracción, los cuales se muestran en la **Tabla 4.2-5**.

**Tabla 4.2-2. Preparación disoluciones controles en acetato de etilo.**

Código Muestra	Volumen Disolución MIX ( $\mu$ L)	Volumen acetato de etilo ( $\mu$ L)	Concentración resultante ( $\mu$ M)
C <sub>0</sub> (control)	0	2000	0
C <sub>5</sub> (control)	5	1995	5
C <sub>10</sub> (control)	10	1990	10
C <sub>20</sub> (control)	20	1980	20
C <sub>50</sub> (control)	50	1950	50
C <sub>100</sub> (control)	100	1900	100

**Tabla 4.2-3 Muestras de Extracción.** Se muestra el volumen de la Disolución MIX utilizado, de PBS y del disolvente. Se hicieron por duplicado.

Código Muestra	Volumen Disolución MIX (μL)	Volumen PBS (μL)	Volumen acetato de etilo para la extracción (μL)
MA <sub>0</sub>	0	2000	2000
MA <sub>5</sub>	5	2000	2000
MA <sub>10</sub>	10	2000	2000
MA <sub>20</sub>	20	2000	2000
MA <sub>50</sub>	50	2000	2000
MA <sub>100</sub>	100	2000	2000

**Tablas 4.2-4. Extracción a diferentes concentraciones de analito. Medidas por GC-MS.** Se muestra las áreas de los picos cromatográficos correspondientes a 4-nitrofenol, paraoxón y paratión de extracciones. M005, M010, M020, MA050 y M100 son muestras de concentraciones 5, 10, 20, 50 y 100 μM extraídas.

t <sub>R</sub> (min)	Replicado 1 de extracción			Replicado 2 de Extracción		
	pNP	PXN	PTN	pNP	PXN	PTN
	<b>7,316</b>	<b>11,651</b>	<b>12,314</b>	<b>7,316</b>	<b>11,651</b>	<b>12,314</b>
<b>M005</b>	84327	70462	168963	205128	90426	189050
	129472	83372	185534	113192	99706	156851
	540147	96738	142322	292821	102155	169425
<b>Media</b>	<b>251.315</b>	<b>83.524</b>	<b>165.606</b>	<b>203.714</b>	<b>97.429</b>	<b>171.775</b>
<b>D.E</b>	251.152	13.139	21.801	89.823	6.187	16.228
<b>% DE</b>	99,94%	15,73%	13,16%	44,09%	6,35%	9,45%
<b>M010</b>	715842	331616	601104	705272	325539	595951
	831659	335967	628404	544012	369500	516472
	731627	341670	476318	574462	331604	490893
<b>Media</b>	<b>759.709</b>	<b>336.418</b>	<b>568.609</b>	<b>607.915</b>	<b>342.214</b>	<b>534.439</b>
<b>D.E</b>	62.808	5.042	81.083	85.677	23.824	54.785
<b>Porcentaje</b>	8,27%	1,50%	14,26%	14,09%	6,96%	10,25%
<b>M020</b>	1929571	786858	1300257	2051686	854363	1327517
	1985089	799374	1319836	1132262	854993	1087318
	1297189	770899	989477	1217026	812005	1063173
<b>Media</b>	<b>1.737.283</b>	<b>785.710</b>	<b>1.203.190</b>	<b>1.466.991</b>	<b>840.454</b>	<b>1.159.336</b>
<b>D.E</b>	382.142	14.272	185.340	508.131	24.639	146.148
<b>Porcentaje</b>	22,00%	1,82%	15,40%	34,64%	2,93%	12,61%
<b>M050</b>	4786025	2080664	2908238	5207432	2134581	3026985
	4984365	1979356	3054081	3177685	2090264	2502795
	2755075	1852444	2231749	3654994	2274890	2687586
<b>Media</b>	<b>4.175.155</b>	<b>1.970.821</b>	<b>2.731.356</b>	<b>4.013.370</b>	<b>2.166.578</b>	<b>2.739.122</b>
<b>D.E</b>	1.233.817	114.349	438.774	1.061.270	96.382	265.868
<b>Porcentaje</b>	29,55%	5,80%	16,06%	26,44%	4,45%	9,71%
<b>M100</b>	10832019	4668860	6098715	11108242	4680994	6072766
	10996598	4735552	6294987	6793136	3951975	4735683
	6775137	3864309	4456746	7165003	3983856	4735170
<b>Media</b>	<b>9.534.585</b>	<b>4.422.907</b>	<b>5.616.816</b>	<b>8.355.460</b>	<b>4.205.608</b>	<b>5.181.206</b>
<b>D.E</b>	2.391.168	484.908	1.009.432	2.391.219	412.005	772.113
<b>Porcentaje</b>	25,08%	10,96%	17,97%	28,62%	9,80%	14,90%

**Tabla 4.2-5. Porcentajes de extracción. Prueba de extracción con diferentes concentraciones de analitos.** M005, M010, M020, MA050 y M100 son muestras de concentraciones 5, 10, 20, 50 y 100  $\mu\text{M}$  extraídas. Se dan los % de extracción correspondientes al experimento mostrado en la **Tabla 4.2.4.**

<b>Código Muestra</b>	<b>4-nitrofenol</b> (tR=7,316 min)	<b>paraoxon</b> (tR=11,653 min)	<b>paratión</b> (tR=12,316 min)
<b>M005</b>	71,1%	53,7%	59,7%
<b>M005'</b>	57,6%	62,6%	61,9%
<b>M010</b>	93,9%	85,0%	89,8%
<b>M010'</b>	75,1%	86,5%	84,4%
<b>M020</b>	82,8%	78,1%	82,6%
<b>M020'</b>	69,9%	83,5%	79,6%
<b>M050</b>	76,3%	79,2%	81,7%
<b>M050'</b>	73,4%	87,1%	81,9%
<b>M100</b>	88,6%	90,5%	91,5%
<b>M100'</b>	77,7%	86,0%	84,4%

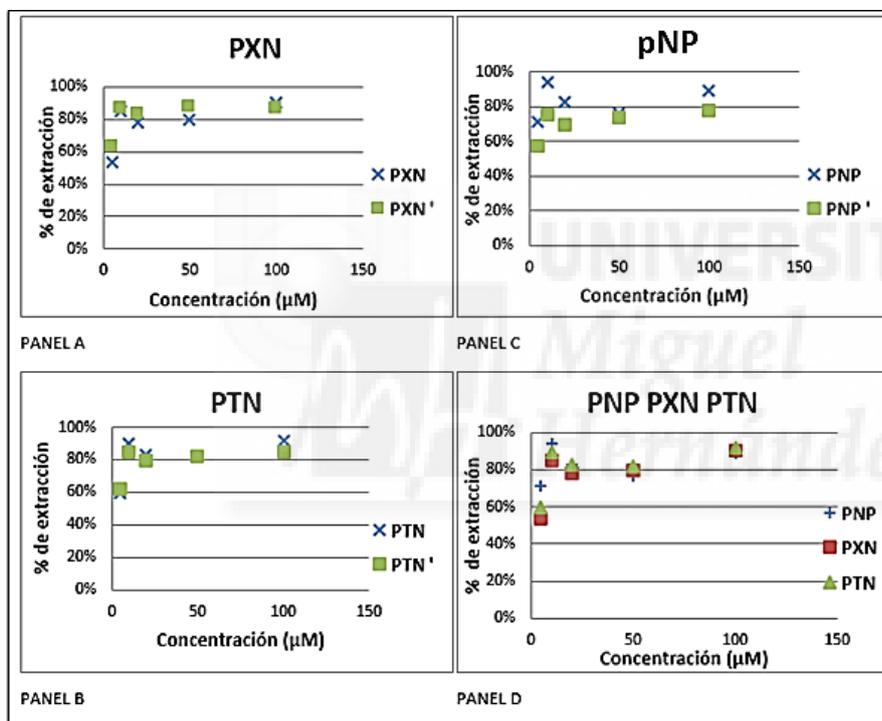
Se puede apreciar como los porcentajes de extracción obtenidos en esta extracción son bastantes altos, obteniendo valores no inferiores al 50 % de extracción en ninguno de los casos, lo cual se traduce en el correcto desarrollo de la extracción y que el método utilizado en la Cromatografía de gases era el adecuado para poder detectar los tres compuestos presentes en los viales.

Además se observa como existe extracción tanto a concentraciones muy bajas (5  $\mu\text{M}$  de MIX), como a concentraciones mucho más elevadas (100  $\mu\text{M}$  de MIX), aunque no existe correlación numérica, es decir, si se compara los porcentajes de extracción de vial que presenta 50  $\mu\text{l}$  de MIX, no son justamente la mitad que los valores del vial que contiene el doble de MIX, 100  $\mu\text{l}$ . Por otra parte, los porcentajes de los tubos duplicados no presentan el mismo valor que sus tubos simples, es decir el tubo con 5  $\mu\text{l}$  de MIX no tiene los mismos porcentajes de extracción que su duplicado.

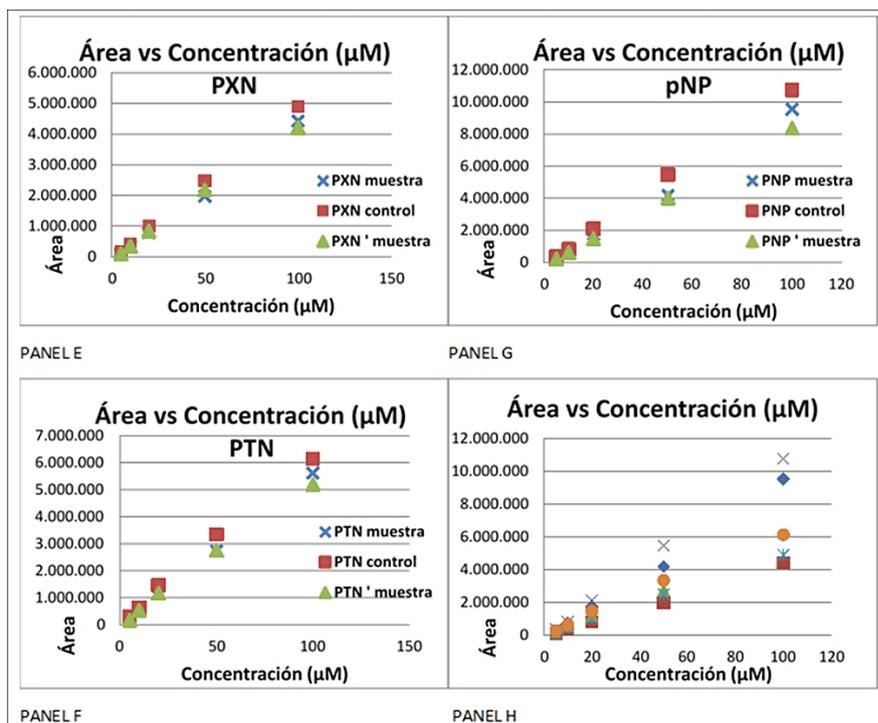
A la vista de los resultados, se decidió emplear estos valores para representar distintas gráficas, que permiten visualizar de forma más clara por una parte, el porcentaje de extracción frente a la concentración de todos los compuestos (**Figura 4.2-1**), y por otra parte que permitiera analizar la relación entre el área y la concentración de cada vial de todos los compuestos y de cada compuesto por separado (**Figura 4.2-2**).

En la **Figura 4.2-1** se puede apreciar como con la concentración más baja de la Disolución MIX se obtienen los porcentajes de extracción más bajos para todos los compuestos, y luego progresivamente, estos porcentajes van aumentando a medida que aumenta también la concentración de la Disolución MIX, aunque este aumento no es proporcional. Por otro lado, también se puede ver como los porcentajes de extracción para los replicados 2 de extracción son muy parecidos a los porcentajes de los replicados 1 de extracción, lo cual demuestra la correcta reproducibilidad de la extracción y del método cromatográfico utilizado. Se aprecia como el compuesto con porcentajes más parecidos entre sus replicados es el PTN (panel B), en contra, el compuesto con mayor variabilidad entre replicados es el pNP (panel C).

En la **Figura 4.2-2** se puede apreciar como la reproducibilidad de la prueba es bastante alta puesto que los tubos correspondientes al replicado 2 de extracción tienen áreas muy parecidas a sus correspondientes replicados 1 de extracción. Por otra parte, se observa el aumento proporcional de las áreas a medida que aumenta la concentración de Disolución MIX, es decir a medida que aumenta la concentración de Disolución MIX, aumenta el área, hecho que ocurre en todos los compuestos tanto en los controles, como en los replicados 1 de extracción como en los replicados 2 de extracción. Además si nos fijamos en los valores de las áreas, se percibe que el compuesto con el que se obtiene áreas mayores es el pNP (panel G). Asimismo, también se observa como en todos los casos, las áreas más altas se obtienen con los tubos control, como cabría esperar, seguido de los replicados 1 de extracción y por último los replicados 2 de extracción.



**Figura 4.2-1.** Representación de los porcentajes de extracción de la **Tabla 4.2-6** frente a la concentración (µM). Representación del PXN (panel A), representación PTN (panel B), representación p-NP (panel C) y representación del conjunto de todos los analitos (panel D).



**Figura 4.2-2.** Áreas de los picos de las extracciones de la **Tabla 4.2-5** frente a la concentración ( $\mu\text{M}$ ). PXN (panel E), PTN (panel F), p-NP (panel G) y representación del conjunto de todos los analitos (panel H).

### 4.3. EXPERIEMTOS DE DEGRADACIÓN

#### 4.3.1. Degradación de paraoxón con suero de conejo midiendo el resultado por GC-MS

Siguiendo el procedimiento y la preparación de los diferentes tubos según lo establecido en el apartado Métodos, se obtuvieron una gran variedad de resultados en lo referente a este experimento, de los cuales se seleccionaron los que se muestran en la **Tabla 4.3-1** y en la **Figura 4.3-1**.

Se seleccionaron dos muestras, Ca 100 y EDTA 100 (los volúmenes y compuestos por los que están formados se muestran en la **Tabla 3.2-1** y se procedió a calcular el área de los picos

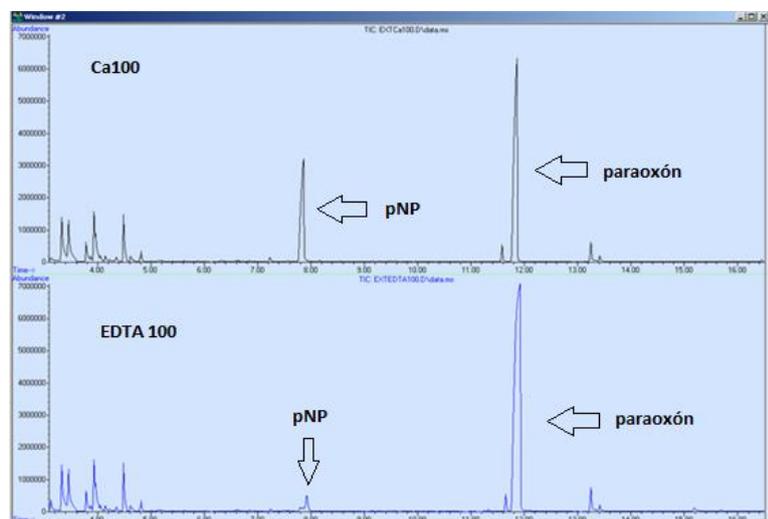
**Tabla 4.3-1.** Áreas del p-nitrofenol y paraoxón en las muestras Ca 100 y EDTA 100. Experimento de paraoxón con suero de conejo midiendo por GC-MS.

	P-nitrofenol	Paraoxón
<b>Ca 100</b>	124420117	268289957
<b>EDTA 100</b>	21324347	532235990

resultantes en el cromatógrafo del p-nitrofenol y del paraoxón (**Tabla 4.3-1**).

Como se observa la muestra que contiene Ca presenta un área mayor para el pico de p-nitrofenol, mientras que para el pico del paraoxón ocurre todo lo contrario, hecho que también se puede apreciar en la **Figura 4.3-1**. Donde se observa un pico más alto para el p-nitrofenol en el caso de la muestra Ca100 y un pico más pequeño para el paraoxón. Por otra parte, se puede apreciar como

quizás la señal del paraoxón se encuentre un poco saturada, lo que dificulta un poco su interpretación.



**Figura 4.3-1.** Cromatograma de la muestra Ca100 (arriba) y de la muestra EDTA100 (abajo). Experimento de paraoxón con suero de conejo midiendo por GC-MS.

#### 4.3.2. Degradación de paraoxón y paratión con sueros de conejo y pollo, midiendo colorimétricamente el 4-nitrofenol formado.

Con el objetivo de medir la degradación del paraoxón y del paratión en suero de conejo y del paraoxón en suero de pollo, se procedió a medir colorimétricamente el 4-nitrofenol que se formó en cada caso. Dichos experimentos siguieron el procedimiento explicado en el apartado Métodos.

Todos los valores de absorbancia de las Tablas para cada tiempo son la media entre el valor de absorbancia del replicado 1 y el valor de absorbancia del replicado 2.

Los valores de absorbancia obtenidos en la degradación con suero de conejo se muestran en la **Tabla 4.3-2.** y en las **Tablas 4.3-3 y 4.3-4** con suero de pollo. Para el paratión con suero de conejo se muestran en la **Tabla 4.3-5.**

**Tabla 4.3-2.** Experimento de degradación de paraoxón en suero de conejo. Media de los valores de absorbancia a 400 nm en suero de conejo.

	TIEMPO DE REACCION (MIN)				
	15 MIN	30 MIN	45 MIN	60 MIN	90 MIN
<b>C1</b>	0,826	0,807	0,803	0,801	0,771
<b>C2</b>	0,845	0,815	0,833	0,842	0,818
<b>BL1</b>	0,064	0,071	0,033	0,037	0,03
<b>BL2</b>	0,028	0,028	0,030	0,026	0,027
<b>EDTA10</b>	0,783	0,795	0,790	0,923	0,837
<b>CA10</b>	1,310	1,976	2,841	3,533	3,715
<b>EDTA30</b>	0,684	0,828	0,811	0,934	0,829
<b>CA30</b>	2,128	3,894	4 (saturado)	4 (saturado)	4 (saturado)

**Tabla 4.3-3.** Experimento de degradación de paraoxón en suero de pollo. Media de los valores de absorbancia a 400 nm en suero de pollo con concentraciones de EDTA y Ca<sup>+</sup> de 100 μM.

	TIEMPO DE REACCION (MIN)				
	15 MIN	30 MIN	45 MIN	60 MIN	90 MIN
<b>C1</b>	0,590	0,578	0,692	0,584	0,716
<b>C2</b>	0,640	0,628	0,733	0,626	0,734
<b>BL1</b>	0,152	0,143	0,103	0,152	0,136
<b>BL2</b>	0,026	0,026	0,028	0,030	0,029
<b>EDTA100</b>	0,721	0,824	0,735	0,831	0,722
<b>CA100</b>	0,729	0,864	0,751	0,864	0,745

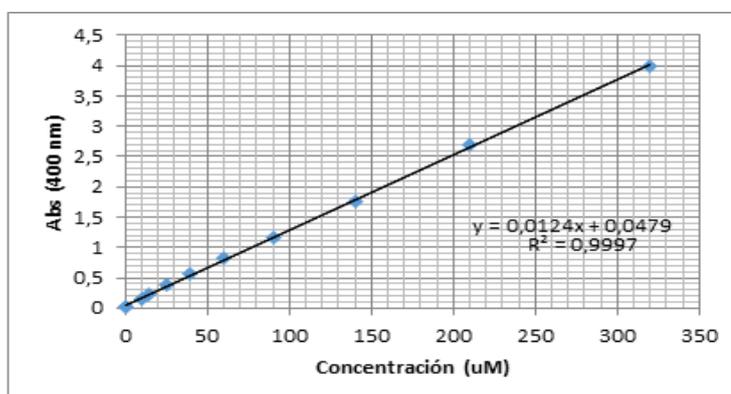
**Tabla 4.3-4.** Experimento de degradación en suero de pollo. Media de los valores de absorbancia a 400 nm en suero de pollo con concentraciones de EDTA y Ca<sup>+</sup> de 10 y 30 μM.

	TIEMPO DE REACCION (MIN)				
	15 MIN	30 MIN	45 MIN	60 MIN	90 MIN
<b>C1</b>	0,685	0,694	0,701	0,701	0,688
<b>C2</b>	0,682	0,719	0,71	0,712	0,704
<b>BL1</b>	0,042	0,043	0,04	0,043	0,044
<b>BL2</b>	0,026	0,027	0,026	0,027	0,027
<b>EDTA10</b>	0,663	0,851	0,682	0,678	0,687
<b>CA10</b>	0,679	0,879	0,699	0,703	0,689
<b>EDTA30</b>	0,680	0,874	0,692	0,606	0,687
<b>CA30</b>	0,695	0,830	0,703	0,711	0,688

**Tabla 4.3-5.** Experimento de degradación de paratión en suero de conejo. Media de los valores de absorbancia a 400 nm en suero de conejo.

	TIEMPO DE REACCION (MIN)				
	15 MIN	30 MIN	45 MIN	60 MIN	90 MIN
<b>C1</b>	0,028	0,028	0,028	0,029	0,032
<b>C2</b>	0,031	0,029	0,030	0,030	0,030
<b>BL1</b>	0,257	0,199	0,235	0,238	0,257
<b>BL2</b>	0,027	0,027	0,028	0,028	0,027
<b>EDTA30</b>	0,055	0,071	0,078	0,077	0,078
<b>CA30</b>	0,055	0,083	0,083	0,082	0,082
<b>EDTA100</b>	0,253	0,288	0,290	0,289	0,285
<b>CA100</b>	0,118	0,155	0,152	0,151	0,148

Concentración (μM)	Abs (400nm)
320	4
210	2,685
140	1,762
90	1,15
60	0,816
40	0,577
25	0,372
15	0,234
10	0,162
0	0,027
0	0,029



**Figura 4.3-2.** Valores utilizados de absorbancia a 400 nm y concentración (μM) para realizar la curva de calibrado del p-nitrofenol (panel a la izquierda). Curva de calibrado del p-nitrofenol (panel a la derecha).

## 5 DISCUSIÓN

### 5.1 SOBRE LA OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO

En el laboratorio del Prof. Vilanova, se habían establecido previamente algunos parámetros del método de medida simultánea de paratión, paraoxón y 4-nitrofenol. Se había ya seleccionado el tipo de columna, sistema de inyección, temperatura de la cámara de inyección y condiciones de detector de masas. Ahora bien, estos parámetros fueron de nuevo comprobados (resultados no mostrados). En esta memoria se muestra los ensayos específicos para establecer parámetros que no habían sido optimizados anteriormente, fundamentalmente el tiempo de purga y la temperatura inicial del gradiente de temperatura del horno.

Se compararon distintos **tiempos de purga**, obteniendo así distintos resultados de la mismas muestras. Las imágenes demuestran resultados evidentes, con tiempos de purga pequeños los picos cromatográficos para los tres compuestos son bajos, más anchos y con menor señal (abundancia), por lo contrario, al aumentar el tiempo de purga, estos picos se estrecharon y aumentó la señal. Se estableciera el tiempo de purga idóneo como 0'75 min.

En cuanto a la **temperatura inicial** se pudo apreciar que a las temperaturas más bajas ensayadas los picos son anchos y con presencia de "codos" del cromatograma. En cambio, a temperaturas superiores, los resultados mejoran considerablemente con picos más estrechos con mejor resolución, aunque existe un límite, por lo que estableció a temperatura inicial en 90°C.

### 5.2 SOBRE LOS EXPERIMENTOS DE EXTRACCIÓN

Se realizaron **extracciones**, con dos condiciones una sin HCl y la otra añadiendo HCl para simular la situación en la que se usa ácido para detener reacciones enzimáticas. Se concluyó que la extracción que mejores resultados muestra es la extracción que sin HCl en el medio. Con HCl, los porcentajes de extracción disminuyeron considerablemente, por lo que la opción de emplear HCl se descartó.

Se ensayan diferentes concentraciones de analitos. Se observó que, para cada pico correspondiente con cada compuesto, existe muy poca variación entre los valores de las áreas entre las tres medidas replicadas de cada vial. Este hecho manifiesta de nuevo la reproducibilidad del método cromatográfico. Igualmente, los porcentajes de extracción calculados fueron suficientemente altos por lo que la metodología elegida es adecuada.

En la prueba de degradación del paraoxón y posterior medida por GC-MS., se apreció que en presencia de Ca se produce una mayor degradación del paraoxón dando lugar a una mayor cantidad de p-nitrofenol formado que en ausencia de Ca (en presencia de EDTA como agente complejante de calcio (**Tabla 4.3-1** y **Figura 4.3-1**). El 4-nitrofenol observado en las muestras tratadas en ausencia de calcio, se asume que es debido a la suma de la hidrólisis espontánea, presencia de impurezas de 4-nitrofenol en la muestra de paraoxón más hidrólisis por enzimas no dependientes de calcio (por ejemplo albúmina). Experimentos similares se hicieron con suero de pollo.

En este trabajo no se ha realizado una detallada cuantificación de estos ensayos de biodegradación pero se pudo constatar la validez de la metodología para estudios posteriores previstos en el laboratorio en los que se pretende la cuantificación detallada y comparativa.



## 6 CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

### 6.1 CONCLUSIONES

1. Los parámetros del método cromatográfico que se han optimizado en este trabajo son el tiempo de purga (0'75 min), la temperatura inicial (90°C) y optando por el empleo de inyección sin división ("splitless").
2. El método óptimo es capaz de detectar y cuantificar los tres compuestos (PXN, PTN y pNF) para los fines previstos.
3. Se descarta el uso de HCl en las pruebas de extracción, por obtener con dicha sustancia porcentajes de extracción más bajos.
4. La metodología de la extracción se ensayó con distintas concentraciones de los analitos. Con porcentajes de extracción superiores al 50 % que alcanzan valores de más de 90%. Aunque se necesitará posterior optimización, se concluye que el procedimiento es simple y puede ser apropiado para estudios posteriores de biodegradación
5. La prueba de degradación de paraoxón en suero de conejo y su medida posterior por GC-MS, mostró diferencia entre la presencia o ausencia de Ca en el medio, por la diferencia de la cantidad de p-nitrofenol formado a causa de la hidrólisis del paraoxón dependiente de Ca, tanto midiendo por cromatografía de gases, como midiendo el 4-nitrofenol colorimétricamente. Las medidas por estos procedimientos son viables para estudios detallados posteriores.

### 6.2 PROYECCIÓN FUTURA

Gracias a la especificación de los parámetros idóneos del método cromatográfico para poder medir estos tres compuestos, se podrán llevar a cabo medidas que proporcionen resultados sobre el comportamiento cinético y factores que influyen en la activación tóxica y degradación de paratión y paraoxón, así como otros compuestos organofosforados similares.

En base a la metodología valorada se podrán hacer posteriormente estudios como los siguientes:

- a) Activación tóxica de paratión a paraoxón en modelos in vitro (ex vivo) con muestras de tejidos animales desuero, hígado y sistema nervioso.
- b) Degradación de paraoxón en los mismos tejidos.
- c) Proceso conjunto de activación y degradación, con medida simultánea de los tres compuestos.

En ellos, se podrá valorar la influencia de factores diversos, como calcio y otros cationes como cofactores, estado aerobio o anaerobio, así como valoraciones cinéticas detalladas, a fin de establecer la importancia relativa del balance entre activación tóxica y destoxicación.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agilent (2001) Información para el usuario del 6890N Referencia G1530-95210. Agilent technologies.
- Albores A, Ortega-Mantilla G, Sierra-Santoyo A, Cebrián ME, Muñoz-Sánchez JL, Caldero-Salinas JV, Manno M. (2001) Cytochrome P450 2B (CYP2B)-mediated activation of methyl-parathion in rat brain extracts *Toxicology Letters* 124 (2001) 1–10
- Romero AC; Eva del Río; Eugenio Vilanova; MIGUEL A SOGORB (2015), RNA transcripts for the quantification of differentiation allow marked improvements in the performance of embryonic stem cell test (EST). *Toxicology Letter* (accepted 6 August 2015)
- Baltazar MT, Dinis-Oliveira RJ, de Lourdes Bastos M, Tsatsakis AM, Duarte JA, Carvalho F. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases--a mechanistic approach. *Toxicol Lett.* 2014;230(2):85-103.
- Barril J, Estévez J, Escudero MA, Céspedes MV, Níguez N, Sogorb MA, Monroy A, Vilanova E (1999) Peripheral nerve soluble esterase are spontaneously reactivated after inhibition by paraoxon: implication for a new definition of Neuropathy target Esterase. *Chem Biol Interaction*, 119-120: 541-550
- Benabent M; Vilanova E; Mangas I; Sogorb MA; Estévez J (2014) Interaction between substrates suggests a relationship between organophosphorus-sensitive phenylvalerate esterase and acetylcholinesterase activities in chicken brain. *Toxicology Letters*, 230:132-138
- Casida JE, Quistad GB. Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chem Res Toxicol.* 2004;17(8):983-98.
- Darío Cortez R (1998). *Cromatografía de gases, Gas Chromatography, Tutoriales.* Red Latinoamericana de Química. Disponible el día 01/09/2015
- Estevan C, Vilanova E, Sogorb MA (2013) Chlorpyrifos and its metabolites alter gene expression at non-cytotoxic concentrations in D3 mouse embryonic stem cells under in vitro differentiation: Considerations for embryotoxic risk assessment. *Toxicology Letters* 217: 14– 22. ISSN 0378-4274.
- Estevez J, Barril JB, Vilanova E (2010). Inhibition with spontaneous reactivation and the “ongoing inhibition” effect of esterases by biotinylated organophosphorus compounds: S9B as a model. *Chem Biol Interact.* 187:397-402.
- Estévez J, García-Pérez A, Barril J, Pellín MC, Vilanova E (2004). The inhibition of the high sensitive peripheral nerve soluble esterases by mipafox. A new mathematical processing for the kinetics of inhibition of esterases by organophosphorus compounds. *Toxicology Letters* 151:243-249
- Estévez J, Vilanova E, Garcia-Perez A, Barril J (2001) The in vitro properties of soluble peripheral nerve esterases are compatible with being involved as target of induction and promotion of organophosphorus induced polyneuropathy *Toxicology* 164: 219-220

- Estevez, Jorge; Mangas, Iris; Angel Sogorb, Miguel Angel; Vilanova, Eugenio (2013; Interactions of neuropathy inducers and potentiators/promoters with soluble esterases *Chemico-Biological Interactions*, 203: 245-250
- Garcia-Perez AG, Barril J, Estévez J, Vilanova E (2003) Properties of phenyl valerate esterase activities from chicken serum are comparable with soluble esterases of peripheral nerves in relation with organophosphorus compounds inhibition. *Toxicology Letters* 142, 1-10
- López-Granero C, Cardona D, Giménez E, Lozano R, Barril J, Aschner M, Sánchez-Sante F, Cañadasa, F, (2014). Comparative study on short- and long-term behavioral consequences of organophosphate exposure: Relationship to AChE mRNA expression. *NeuroToxicology*, 40, 57–64.
- Mangas I, Taylor P, Vilanova E, Estévez J, Franca T, Radić Z (2015) Resolving pathways of interaction of mipafox and a sarin-analogue with human acetylcholinesterase by kinetics, mass spectrometry and molecular modeling approaches. *Arch Toxicol* (accepted 12 Feb 2015)
- Mangas I, Vilanova E, Estévez J (2011) Kinetics of the inhibitory interaction of organophosphorus neuropathy inducers and non-inducers in soluble esterases in the avian nervous system. *Toxicology and Applied Pharmacology* 256 (2011) 360–368,
- Mangas I, Vilanova E, Estévez J (2014) Kinetic interaction of a neuropathy potentiator (phenylmethylsulfonyl fluoride) with Neuropathy Target Esterase and other membrane bound esterases. *Archives of Toxicology*. 88:355-366
- Monroy-Noyola A, Sogorb MA, Vilanova E (2007) Stereospecific hydrolysis of a phosphoramidate as a model to understand the role of biotransformation in the neurotoxicity of chiral Organophosphorus compounds. *Toxicol Lett*. 157-164
- Monroy-Noyola A, Trujillo B, Yescas P, Martínez-Salazar F, García-Jiménez S, Ríos C, Vilanova E (2014) Stereospecific hydrolysis of a phosphoramidate used as an OPIDP model by human sera with PON1 192 alloforms. *Arch Toxicol* <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-014-1327-2>
- Pamies D, Bal-Price A, Fabbri M, Gribaldo L, Scelfo B, Harris G; Collotta A; Vilanova E, Sogorb MA. (2014) Silencing of PNPLA6, the Neuropathy Target Esterase (NTE) codifying gene, alters neurodifferentiation of human embryonal carcinoma stem cells (NT2). *Neuroscience* (accepted 19-08-2014)
- Pellín, M. C., Moretto, M., Lotti, M. y Vilanova, E. (1990). Distribution and some properties of rat paraoxonase activity. *Neurotoxicol. and Teratol*. 12: 611-614.
- Romero AC, Vilanova E, Sogorb MA (2011) Shortening and improving the embryonic stem cell test through the use of gene biomarkers of differentiation. *Journal of Toxicology*, vol 2011, Article ID 286034 8 pages, 2011
- Satoh T, Hosokawa M. Organophosphates and their impact on the global environment. *Neurotoxicology*. 2000;21(1-2):223-7.

- Sogorb MA, Álvarez-Escalante C, Carrera V, Vilanova E (2007) An in vitro approach for demonstrating the critical role of serum albumin in the detoxication of the carbamate carbaryl at in vivo toxicologically relevant concentrations. *Archives of Toxicology* 81: 113-119.
- Sogorb MA, Diaz-Alejo, Escudero MA, Vilanova E (1998) Phosphotriesterase activity identified in purified serum albumins. *Arch. Toxicol* 72:219-226
- Sogorb MA, Pamies D, de Lapuente J, Estevan C, Estévez J, Vilanova E. (2014) An integrated approach for detecting embryotoxicity and developmental toxicity of environmental contaminants using in vitro alternative methods. *Toxicology Letters* 230(2): 356-367.
- Sogorb MA, Vilanova E (2010) Serum albumins and detoxication of anti-cholinesterase agents. *ChemBiol Interactions*. 187 (2010) 397–402
- Sogorb MA, Vilanova E. *Técnicas Analíticas Ambientales* (2003). ISBN: 849593657. Ed. Universidad Miguel Hernández.
- Sultatos LG, Minor LD, Murphy SD Metabolic Activation of Phosphorothioate Pesticides: Role of the Liver' (1985) *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 232 624-628
- Valcárcel Cases M, Gómez Hens A (1988) *Técnicas analíticas de separación*. Editorial: REVERTÉ, S. A.
- Vilanova E, Escudero MA, Barril J (1999) NTE soluble isoforms: new perspectives for targets of neuropathy inducers and promoters. *Chem Biol Interaction* 119-120:525-540
- Vilanova E, Sogorb MA (1999) The role of phosphotriesterases in the detoxication of organophosphorus compounds. *Critical Review in Toxicology* 29:21-57
- World Health Organization. Organophosphorus insecticides: a general introduction (EHC 63, 1986), 1986. Disponible en: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc63.htm>