

**“VALIDACIÓN DE UNA TECNICA DE EXTRACCIÓN LIQUIDO – LIQUIDO Y
CONFIRMACIÓN DE PLAGUICIDAS EN MUESTRAS DE INTERÉS FORENSE
POR GC – MS”**

TRABAJO DE GRADO

Requisito parcial para optar al título de Químico Industrial

Presentado por:

OMAR EDUARDO DÍAZ TORRES

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

FACULTAD DE TECNOLOGÍA

ESCUELA DE QUÍMICA

PEREIRA

2013

**“VALIDACIÓN DE UNA TECNICA DE EXTRACCIÓN LIQUIDO – LIQUIDO Y
CONFIRMACIÓN DE PLAGUICIDAS EN MUESTRAS DE INTERÉS FORENSE
POR GC – MS”**

Presentado por:

OMAR EDUARDO DÍAZ TORRES

TRABAJO DE GRADO

Requisito parcial para optar al título de Químico Industrial

Director:

Juan Pablo Arrubla Vélez Qco. MSc.

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

FACULTAD DE TECNOLOGÍA

ESCUELA DE QUÍMICA

2013

NOTA DE ACEPTACIÓN

“VALIDACIÓN DE UNA DE EXTRACCIÓN LIQUIDO – LIQUIDO Y CONFIRMACIÓN DE PLAGUICIDAS EN MUESTRAS DE INTERÉS FORENSE POR GC – MS”

Presentado por:

OMAR EDUARDO DÍAZ TORRES

Los suscritos directores y jurados del presente trabajo de grado, una vez revisada la versión escrita y presenciado la sustentación oral, decidimos otorgar la nota de:

Con la connotación:

Para la constancia firmamos en la ciudad de Pereira hoy ____ de ____, de ____.

Director: _____

Nombre: JUAN PABLO ARRUBLA VÉLEZ

CC.: 89006921

Evaluador: _____

Nombre: ELEAZAR VARGAS MENA

CC.:

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, mis hermanos y mi novia por su incondicional apoyo, amor e interminable cantaleta.

A mis compañeros y amigos (Jaime, Sandra, Lina, Felipe, Juan Carlos, Fabián, Pablo, Julio) los cuales siempre me acompañaron y dieron animo en los momentos más difíciles, haciendo agradable mi estadía en la universidad.

A las personas de Medicina Legal (Víctor, Eleazar, Diana, Astrid, Ángela) las cuales siempre me ayudaron hasta con las cosas más insignificantes.

A Javier, Vicky, Carlos Humberto, Mancho, personal del laboratorio de química y a los profesores Arrubla, Tamayo y todos los demás profesores de la Escuela de Química los cuales nos impartieron todo el conocimiento que más pudieron para nosotros poder enfrentar al mundo real.

INTRODUCCIÓN

Dadas las implicaciones legales que puede tener un resultado de toxicología, el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses Regional Occidente de Colombia, tiene el deber de acreditar y certificar que los métodos analíticos utilizados se encuentren validados, para la identificación de pesticidas y sustancias relacionadas, que conduzcan a una interpretación forense con resultados fiables.

Dentro de los análisis forenses utilizados para la identificación de pesticidas, es el de Cromatografía de gases GC – MS, método avalado por la comunidad científica internacional, que proporciona una buena exactitud y precisión en la presentación de resultados.

La cromatografía de gases es una técnica que consiste en separar mezclas de sustancias de interés analítico, dependiendo del tipo de columna y de las condiciones de funcionamiento o método. Su principal característica es el tiempo que transcurre entre el momento de la inyección de la muestra y la aparición de cada componente, denominándose a este, tiempo de retención (t_R) de acuerdo al método implementado, estandarizado y validado.

En este trabajo se pretende realizar la validación de acuerdo a la norma del método analítico, determinando diversos parámetros para demostrar que el método cumple con los requisitos necesarios para el uso que se va otorgar, dentro de estos esta la precisión, exactitud, especificidad, selectividad, linealidad, límite de detección y límite de cuantificación; por otro lado se evaluará también la idoneidad del sistema, utilizando un tratamiento estadístico para verificar así la validez del método.

Se realizará los respectivos cálculos de incertidumbre y de gráficos de control para verificar si los resultados son confiables y se pueda utilizar el método para su aplicación rutinaria.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
2 JUSTIFICACIÓN	14
3 OBJETIVOS	16
3.1 OBJETIVO GENERAL	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4 ANTECEDENTES	17
5 MARCO TEÓRICO	18
5.1 PLAGUICIDAS	18
5.1.1 Clases de plaguicidas	18
5.1.1.1 <i>Plaguicidas biológicos</i>	18
5.1.1.2 <i>Plaguicidas químicos</i>	19
5.1.2 Clasificación de los plaguicidas por estructura	19
5.1.2.1 <i>Plaguicidas organofosforados</i>	19
5.1.2.2 <i>Plaguicidas organoclorados</i>	26
5.1.2.3 <i>Carbamatos</i>	30
5.2 TOXICOLOGÍA	34
5.2.1 Categorías de los plaguicidas	34
5.2.2 Bioacumulación y biomagnificación de plaguicidas	35
5.2.3 Toxicología forense	35
5.2.3.1 <i>Origen de los plaguicidas</i>	35
5.3 LEGISLACIÓN	36
5.4 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN	39
5.4.1 Extracción líquido – líquido	39
5.4.1.1 <i>Matriz biológica utilizada para el estudio de plaguicidas en el cuerpo (Sangre)</i>	40

5.5	CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)	40
5.5.1	Análisis de datos cromatográficos	41
5.5.2	Detector de espectrometría de masas	41
5.6	VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	41
5.7	PARÁMETROS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO	42
5.7.1	Selectividad	42
5.7.2	Linealidad y Rango	42
5.7.3	Precisión	43
5.7.4	Exactitud	43
5.7.5	Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)	43
5.8	IDONEIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO	43
5.8.1	Parámetros cromatográficos	44
5.8.1.1	<i>Factor de capacidad</i>	44
5.8.1.2	<i>Numero de platos teóricos</i>	44
5.8.1.3	<i>Factor de asimetría</i>	44
5.8.1.4	<i>Resolución</i>	44
5.9	VALOR PREDICTIVO	44
6	METODOLOGÍA	45
6.1	UNIDAD EXPERIMENTAL	45
6.2	PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK Y ESTÁNDAR INTERNO	45
6.3	PREPARACIÓN DE NIVELES PARA LA CURVA A PARTIR DE SOLUCIONES STOCK	45
6.4	DETERMINACIÓN DE VOLUMEN DE EXTRACCIÓN	45
6.5	PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EVALUAR EN EL CROMATÓGRAFO DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS	46
6.6	PREPARACIÓN DE MEZCLAS PARA DETERMINAR IDONEIDAD DEL MÉTODO	48
6.6.1	Estabilidad	48
6.7	PRECISIÓN INTERMEDIA	48
6.8	CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN	48
6.9	VALOR PREDICTIVO	49
6.10	VERIFICACIÓN DEL MÉTODO CON MUESTRAS REALES	49
6.11	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE RESULTADOS EXPERIMENTALES	49
6.11.1	Cálculos de idoneidad	49

6.11.2	Linealidad	50
6.11.3	Precisión intermedia	54
6.11.4	Valores predictivos	54
7	CONDICIONES DEL CROMATÓGRAFO DE GASES Y DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS	55
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
8.1	VOLÚMENES DE EXTRACCIÓN	56
8.2	IDONEIDAD	58
8.2.1	Parámetros cromatográficos	59
8.3	LINEALIDAD DEL MÉTODO	61
8.4	PRECISIÓN	66
8.4.1	Repetibilidad	67
8.4.2	Precisión intermedia	68
8.5	VALORES PREDICTIVOS	70
8.6	ESTABILIDAD	70
9	ESTUDIO DE CASOS	73
10	CONCLUSIONES	74
	BIBLIOGRAFÍA	75

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Categorías toxicológicas, vías de ingestión y DL ₅₀	34
Tabla 2. Resoluciones vigentes para el control de plaguicidas en Colombia	37
Tabla 3. Análisis de varianza. ANOVA	52
Tabla 4. Evaluación de metodología según las hipótesis planteadas	53
Tabla 5. Anova precisión intermedia	54
Tabla 6. Volúmenes utilizados para el carbofurano	56
Tabla 7. Volúmenes utilizados para el Aldrín	57
Tabla 8. Números analíticos de mérito del método cromatográfico de los analitos de interés	60
Tabla 9. Criterios de aceptación para los parámetros cromatográficos	60
Tabla 10. Fragmentaciones moleculares de los compuestos de interés	61
Tabla 11. Linealidad del sistema	62
Tabla 12. Datos obtenidos para el análisis t – student de linealidad del carbofurano	63
Tabla 13. Datos obtenidos para el análisis t – student de linealidad del heptacloro	63
Tabla 14. Datos obtenidos para el análisis t – student de linealidad del clorpirifós	64
Tabla 15. Datos obtenidos para el análisis t – student de linealidad del paratión	64
Tabla 16. Datos obtenidos para el análisis t – student de linealidad del propoxur	65
Tabla 17. Anova carbofurano	65
Tabla 18. Anova heptacloro	65
Tabla 19. Anova clorpirifós	66
Tabla 20. Anova paratión	66

Tabla 21. Anova propoxur	67
Tabla 22a. Datos obtenidos para el análisis de repetibilidad	67
Tabla 22b. Datos obtenidos para el análisis de repetibilidad	68
Tabla 23. Datos obtenidos para el análisis de precisión intermedia para el propoxur	69
Tabla 24. Anova de precisión intermedia del propoxur en el sistema	69
Tabla 25. Resultados valores predictivos	70
Tabla 26. Resultados de estabilidad	71
Tabla 27. Resultados de estabilidad con plaguicidas guardados desde 2011	72

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura básica de los plaguicidas organofosforados	19
Figura 2. Estructura del Clorpirifós	20
Figura 3. Estructura del Malatión	21
Figura 4. Estructura del Metilparatión	22
Figura 5. Estructura del Dimetoato	23
Figura 6. Estructura del Clorfenvinfos	24
Figura 7. Estructura del Diclorvos	25
Figura 8. Estructura del Etión	26
Figura 9. Estructuras del Aldrín y el Dieldrín	28
Figura 10. Estructura del Endosulfan	28
Figura 11. Estructura del Tetradifon	29
Figura 12. Estructura del Heptacloro	30
Figura 13. Estructura básica de carbamatos	30
Figura 14. Estructura del Carbaril	31
Figura 15. Estructura del Carbofurano	32
Figura 16. Estructura del Metomilo	33
Figura 17. Estructura del Propoxur	34
Figura 18. Mezcla de muestra con solución extractora compuesta por hexano, acetona y diclorometano	46
Figura 19. Filtrado de la muestra	47
Figura 20. Secado de la mezcla	47
Figura 21. Cromatógrafo de gases (GC) Agilent Technologies 7890 ^a acoplado a espectrómetro de masas cuadrupolo (MS) Agilent Technologies 5975C	48
Figura 22. Incidencia del volumen en la extracción del carbofurano	56

Figura 23. Incidencia del volumen de extracción del Aldrín	58
Figura 24a. Cromatograma que contiene una mezcla de analitos de interés	58
Figura 24b. Cromatograma que contiene una mezcla de analitos de interés	59
Figura 25. Linealidad del heptacloro	62

1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Colombia y en especial la región del eje cafetero como producto de una economía basada en la agricultura, se ha visto avocada al uso indiscriminado de plaguicidas para el control de diversas plagas. Debido a su toxicidad intrínseca, más no a la selectividad de la mayor parte de estos productos, los plaguicidas pueden poner en riesgo el medio ambiente y la salud humana, causando lesiones crónicas, agudas y la muerte, ya sea por razones accidentales, ocupacionales, suicidas u homicidas. Independiente de la causa de intoxicación, diferentes entidades estatales han tenido la necesidad de desarrollar metodologías que les permitan identificar y cuantificar dichos pesticidas en diferentes tipos de matrices, bien sea para el manejo clínico o para la solución de casos forenses.

En el presente trabajo se muestran los resultados de una metodología de extracción líquido – líquido en el laboratorio de toxicología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses Seccional Regional Occidente para la determinación de plaguicidas combinada con cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), que permita la extracción e identificación de plaguicidas y su aplicación en el análisis forense en sangre como fluido biológico, para ser usada, de manera rutinaria, en análisis toxicológicos y en la solución de casos forenses.

El desarrollo y validación de las metodologías para determinación de plaguicidas en muestras de interés forense por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas brindará confianza a los clientes y demás partes interesadas en la calidad de los dictámenes, la competencia del laboratorio, a la misma medida que aporta al logro de la misión, la visión y los objetivos institucionales.

Entonces se requiere establecer una metodología analítica aplicable en el laboratorio de toxicología de la Regional Occidente del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, mediante una propuesta de extracción muy necesaria para la solución de casos homicidas, suicidas y de intoxicación que llegan al instituto.

Esto es necesario para poder emitir conceptos verídicos validados que permitan a la parte investigadora y a la fiscalía en general poder llegar a una conclusión válida en un caso determinado, el cual tenga implicado el uso de plaguicidas.

2 JUSTIFICACIÓN

Dos y medio de millones de toneladas de pesticidas son utilizados alrededor del mundo anualmente. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente ocurren tres millones de casos de intoxicación a nivel mundial cada año y de estos doscientos veinte mil terminan en muerte. Aunque el mayor uso de pesticidas lo tienen los países desarrollados, la mayoría de intoxicaciones son reportadas en los países sub – desarrollados y en desarrollo ^[1].

En Colombia, como en el resto de mundo, no se puede concebir una agricultura sin plaguicidas, pues sin ellos nuestras cosechas disminuirían en un 50%. El país consume 40.000 toneladas de plaguicidas por año, a través de 1.500 formulaciones registradas en el Ministerio de Salud. En el área Suramericana es el segundo consumidor después de Brasil.

Aunque los plaguicidas han producido grandes beneficios agrícolas, a la vez también graves problemas en la salud y en el medio ambiente debido al mal manejo y uso indiscriminado ^[2]. Sin obviar la importancia de los plaguicidas, tanto en la agricultura como en las actividades de salud pública, son innegables los efectos tóxicos que generan en el ser humano. En animales de laboratorio sometidos a dietas hipo proteicas, las DL₅₀ de algunos plaguicidas pueden disminuir entre 4 y 2.100 veces, situación que podría ser extrapolable al ser humano.

Las vías de entrada al organismo pueden ser varias y simultáneas, siendo las más comunes la vía dérmica, la digestiva y la respiratoria. Los plaguicidas penetran en la piel por difusión pasiva atravesando el estrato córneo. En el medio laboral la vía dérmica es la más importante, pues a través de ella y en función de la superficie de piel expuesta, se absorben cantidades significativas de diversos plaguicidas que varían en su nivel de absorción.

Ya absorbidos, los plaguicidas liposolubles se difunden a través de los componentes grasos de la piel y la sangre, mientras que los de moléculas hidrosolubles lo hacen a través del material proteico intracelular ^[3].

Muchos pesticidas son inestables en solución acuosa, especialmente en la sangre debido a la presencia de estereos, ya que estas los degradan rápidamente ^[4].

El laboratorio de toxicología de la Regional Occidente del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses ha empleado una metodología para el análisis de plaguicidas en muestras de interés forense que emplea extracción líquida y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, la cual no ha sido estandarizada y mucho menos validada, convirtiéndose en una no conformidad

recurrente en los procesos de auditoría de calidad bajo los criterios de la norma ISO 17025 ^[5].

El cierre de la no conformidad requiere el validar la metodología analítica, la redacción de un nuevo procedimiento estandarizado de trabajo y su inclusión en el sistema de gestión de la calidad del laboratorio.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Validar, el método de extracción líquida y de confirmación por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas para la determinación de plaguicidas en muestras de interés forense.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer las condiciones de extracción líquido – líquido y cromatográficas.
- Comparar volúmenes necesarios para las extracciones líquido – líquido de plaguicidas en sangre post – mortem.
- Calcular los criterios de calidad analítica: selectividad, especificidad, precisión, exactitud, linealidad, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, reproducibilidad y valor predictivo para el método de extracción y análisis cromatográfico.
- Evaluar muestras reales de interés forense por medio de los métodos validados.

4 ANTECEDENTES

Los pesticidas son sustancias o mezclas de sustancias que se han propuesto para la prevención, destrucción y anulación de algunas plagas. Estas plagas pueden ser: insectos, ratones y otros animales, cizaña de plantas desconocidas, hongos y microorganismos como bacterias y virus. Aunque estos productos químicos tienen como objeto destruir poblaciones de determinadas especies nocivas, se ha visto que también destruyen especies benéficas, provocando de esta forma un desequilibrio ecológico ^[6] y generando intoxicaciones tanto involuntarias como voluntarias en la población humana.

Por tal motivo se hace necesario desarrollar metodologías que permitan la extracción y detección de este tipo de compuestos en fluidos corporales como la sangre.

Se han realizados diversos estudios de detección de pesticidas en sangre, como es el caso de la determinación de pesticidas en sangre post – mortem y medula ósea de conejos ^[1], en el cual se hace un análisis por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas, otro estudio que se hizo fue el de método de detección en el medio ambiente y sangre humana de pesticidas y compuestos bifenilos policlorados usando extracción líquida y analizada por el mismo método nombrado en el estudio anterior ^[7].

Por tal motivo es necesario contar con una metodología estandarizada y validada para la extracción y análisis de pesticidas en fluidos de carácter forense para su correcta identificación, debido a que esto es necesario para la determinación de las muertes por homicidio y suicidio.

5 MARCO TEÓRICO

5.1 PLAGUICIDAS

Un plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga.

Aunque a menudo hay un mal entendido para referirse solo a los insecticidas, el término de plaguicida también se aplica a los herbicidas, fungicidas y varias otras sustancias utilizadas para el control de plagas. Un plaguicida es también cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a utilizarse como reguladores de plantas, defoliantes o desecantes ^[8].

El término plaguicida está más ampliamente difundido que el nombre genérico exacto biocida (Literalmente: matador de la vida). El término plaguicida sugiere que las plagas pueden ser distinguidas de los organismos no nocivos, que las plagas son totalmente indeseables y que estas solo afectaran a las plagas ^[9].

Pero según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), unas 100.000 personas mueren al año por el uso de plaguicidas y 200.000 quedan intoxicadas de forma aguda por su utilización en la agricultura y la ganadería.

Aunque para la población en general, en cuanto consumidora de productos agrícolas, los riesgos de sufrir consecuencias en su salud por el uso de plaguicidas son muy bajos, siempre que las condiciones de aplicación y eliminación de residuos hayan sido cumplidas correctamente, para los obreros de su manufactura, transporte y aplicación, así como para los agricultores, sobre todo del tercer mundo y de cultivos intensivos, el riesgo es muy grande.

Los plaguicidas se refieren a menudo de acuerdo con el tipo de plaga que controlan. Otra forma de pensar acerca de los plaguicidas es considerar aquellos que son químicos o se derivan de una fuente común o método de producción. Otras categorías incluyen biopesticidas, antimicrobianos, y los dispositivos de control de plagas.

5.1.1 Clases de plaguicidas

5.1.1.1 *Plaguicidas biológicos*

Virus, microorganismos o productos derivados de su metabolismo. Bacterias como *Bacillus thuringensis*, y hongos. Así mismo productos derivados directamente de vegetales, que no se sintetizan químicamente como lo son: la estricnina, nicotina, piretrinas, rotenona, ajo, entre otros ^[10].

5.1.1.2 Plaguicidas químicos

Sustancias químicas desarrolladas por el hombre destinadas a matar, repeler, atraer, regular o interrumpir el crecimiento de seres vivos considerados plagas.

5.1.2 Clasificación de los plaguicidas por estructura

5.1.2.1 Plaguicidas organofosforados

Estos plaguicidas afectan al sistema nervioso mediante la interrupción de la enzima que regula la acetilcolina, un neurotransmisor. La mayoría de los organofosforados son los insecticidas. Se desarrollaron durante el siglo 19, pero sus efectos sobre los insectos, que son similares a sus efectos sobre los seres humanos, fueron descubiertos en 1932. Algunos son muy venenosos (que se utilizaron en la Segunda Guerra Mundial como agentes nerviosos). Sin embargo, generalmente no son persistentes en el medio ambiente.

La fórmula estructural general de estos compuestos, que se caracterizan por la presencia de (en general) tres funciones ester, es la siguiente:

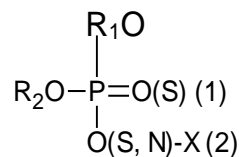


Figura 1. Estructura básica de plaguicidas organofosforados.

En la que R_1 y R_2 son radicales alquilo, generalmente metilo o etilo, el grupo X es característico de cada especie química, siendo frecuentemente un radical arilo, y suele contribuir de forma importante a sus propiedades físicas y químicas y biológicas. A tenor de los elementos concretos que ocupen determinadas posiciones en la molécula, los organofosforados se pueden dividir en 14 grupos, de los que los más importantes son: fosfatos, con un O en las posiciones (1) y (2); O-fosfortioatos (o tionatos), con un S en (1) y un O en (2), S-fosfortioatos (o tiolatos), con un S en (2) y un O en (1); fosforoditioatos (o tiolotionatos), con un S en (1) y en (2); fosfonatos, con R_1 (en lugar de R_1O), O bien S en (1) y O en (2), y fosforoamidatos, con un O en (1) y un N en (2) ^[11].

Algunos pesticidas organofosforados

- **Clorpirifós (Chlorpyrifos)**

Insecticida sólido blanco de apariencia cristalina y de aroma fuerte, que inhibe la acetilcolinesterasa. No es muy soluble en agua, de manera que generalmente se mezcla con líquidos aceitosos antes de aplicarse a cosechas o a animales. También se puede aplicar a cosechas en forma de cápsulas.

El Clorpirifós se ha usado ampliamente en viviendas y en agricultura. En el hogar, se usa para controlar cucarachas, pulgas, y termitas; también se usa en ciertos collares de animales domésticos para controlar pulgas y garrapatas. En agricultura, se usa para controlar garrapatas en ganado y en forma de rocío para el control de plagas de cosechas [12].

Conocido también con el nombre sistemático (IUPAC) de O, O-diethyl O-3, 5, 6-tricloropiridina-2-il fosforotioato además por los nombres comerciales de Affront, Brodan, Bullet, Detmol UA, Dursban, Empire, Eradex, Lorsban, Paqeant, Piridane, Pyrinex, Scout, Stipend [13].

El clorpirifós puede producir una variedad de efectos sobre el sistema nervioso, incluyendo dolores de cabeza, visión borrosa, lagrimeo, excesiva salivación, secreción nasal, mareo, confusión, debilidad o temblores musculares, náusea, diarrea y cambios bruscos en el latido del corazón. El efecto depende de la cantidad de Clorpirifós en el aire y de la duración de la exposición.

Ingerir Clorpirifós a través de envases de alimentos contaminados, o en el caso de los niños, poniendo objetos o las manos en la boca después de tocar Clorpirifós, puede causar síntomas similares.

La exposición a altos niveles puede producir sudor profuso, pérdida del control intestinal, serios temblores musculares, convulsiones, pérdida del conocimiento (coma) o la muerte.

Actualmente no hay ninguna información que demuestre que el Clorpirifós afecte la habilidad de seres humanos para reproducirse o que cause defectos de nacimiento [14].

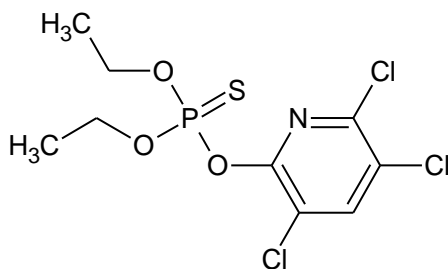


Figura 2. Estructura del Clorpirifós.

- **Malatión (Malathion)**

Insecticida que no ocurre naturalmente. El malatión puro es un líquido incoloro, y el malatión de calidad técnica, que contiene >90% de malatión e impurezas en un solvente, es un líquido pardo-amarillento que huele a ajo.

El malatión se usa para matar insectos en cosechas agrícolas y en jardines, para tratar piojos en la cabeza de seres humanos y para tratar pulgas en animales domésticos. El malatión se usa también para matar mosquitos y la mosca de la fruta en extensas áreas al aire libre.

Conocido también con el nombre sistemático (IUPAC) de Dietil 2-dimetoxifosfinotioilsulfanilbutanodioato además por los nombres comerciales de Derbac-M; Ovide; Prioderm; Quellada M; Suleo-M ^[13].

El malatión interfiere con el funcionamiento normal de los nervios y del cerebro. La exposición a niveles muy altos de malatión en el aire, el agua o los alimentos por un período breve puede causar dificultad para respirar, opresión del pecho, vómitos, calambres, diarrea, visión borrosa, sudor excesivo, mareo, pérdida del conocimiento y la muerte. Si las personas que están expuestas a grandes cantidades de malatión reciben tratamiento apropiado de inmediato, puede que no ocurran efectos adversos a largo plazo. Cuando la exposición es a niveles de malatión más bajos que los que afectan la función de los nervios, parecen ocurrir pocos o ningún problema de la salud ^[14].

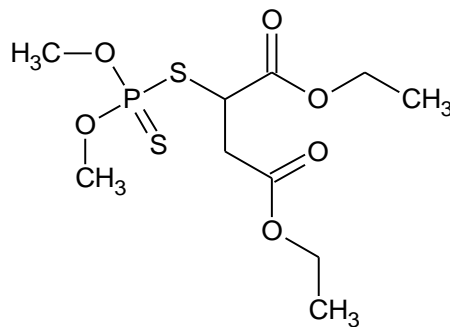


Figura 3. Estructura del Malatión

- **Metilparatión (Methyl Parathion)**

Insecticida que no ocurre naturalmente en el medio ambiente. El metilparatión puro existe en forma de cristales blancos. El metilparatión impuro es un líquido pardusco que huele a huevos podridos.

El metilparatión es usado para matar insectos en cosechas agrícolas, especialmente algodón. Hoy en día, la EPA restringe la manera en que se usa y aplica el metilparatión; solo se permite que gente entrenada lo rocíe. El metilparatión ya no puede ser usado en cosechas de alimentos consumidos comúnmente por niños.

Conocido también con el nombre sistemático (IUPAC) de Ácido fosforotioico O, O-dietil O-(4-nitrofenil) ester además por los nombres comerciales de Alkron;

Aphamite; Folidol; Fostex E; Fosferno 20; Niran; Nitrostigmine; Paraphos; Rhodiatox; Thiophos ^[13].

El metilparatión afecta el funcionamiento normal del sistema nervioso y el cerebro. La exposición a niveles muy altos de metilparatión en el aire o el agua por un período breve puede causar mareo, confusión, dolores de cabeza, dificultad para respirar, opresión del pecho, respiración jadeante, vómitos, diarrea, calambres, visión borrosa, sudor, pérdida del conocimiento y la muerte. Los cambios en la condición mental pueden durar varios meses después que la exposición a altos niveles de metilparatión ha terminado. La exposición a niveles de metilparatión menores que los que afectan la función de los nervios parece producir pocos o ningún problema sobre la salud. Algunos estudios en animales también han descrito una reducción de la habilidad para combatir infecciones; sin embargo, no sabemos si esto también puede ocurrir en seres humanos ^[14].

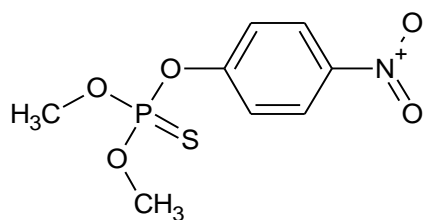


Figura 4. Estructura del Metilparatión

- **Dimetoato (Dimethoate)**

Insecticida organofosforado de acción indirecta, es decir, se convierte en el organismo al metabolismo activo Dimetoxón. Como resultado se desarrollan signos y síntomas de sobreexposición después de un periodo latente y puede continuar aumentando una vez eliminada la exposición. La toxicidad aguda del Dimetoato es moderada y puede ser peligroso para los seres humanos si se le maneja incorrectamente

El Dimetoato es uno de los insecticidas organofosforados más utilizados en todo el mundo.

El Dimetoato es un insecticida organofosforado de amplio espectro. Es sistémico y tiene acción por contacto y por ingestión y se utiliza en todo el mundo contra una amplia gama de insectos chupadores y masticadores (pulgones, moscas de la fruta, ácaros, moscas blancas), en una gran cantidad de cultivos como cítricos, algodón, olivo, patata, cereales, té y tabaco.

Cuando el Dimetoato se degrada, da lugar a subproductos como el isodimetoato, con escasa actividad contra las plagas, de mayor toxicidad para mamíferos y causantes del mal olor característico ^[15].

También conocido con el nombre sistemático (IUPAC) 2-Dimetoxifosfotioilsulfanil-N-metilacetamida además por los nombres comerciales de Cygon; Fostion MM; Rogor E; Roxion [13].

La inhibición de la colinesterasa es el indicador más sensible de exposición al Dimetoato y puede indicar toxicidad. Los signos y síntomas pueden incluir una sensación de agotamiento, cefalea, visión borrosa, debilidad y confusión. Pueden desarrollarse vómitos, dolor abdominal, sudoración excesiva y salivación. Las pupilas se contraen, se puede experimentar dificultad para respirar, debido a la congestión de los pulmones y a la debilidad de los músculos respiratorios. Se han reportado arritmias e insuficiencia cardíaca. En la intoxicación grave se presentan espasmos musculares, pérdidas de conciencia y convulsiones. La respiración puede cesar seguida de la muerte [16].

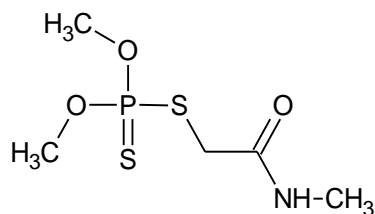


Figura 5. Estructura del Dimetoato

- **Clorfenvinfos (Chlorfenvinphos)**

El clorfenvinfos es el nombre común que se le da a un insecticida organofosforado que se utiliza para el control de plagas que afectan al ganado. En el pasado también se utilizaba en los hogares para controlar plagas de insectos como moscas, pulgas y ácaros. Esta es una sustancia química sintética que no se encuentra en forma natural en el ambiente.

En su forma química pura (100% clorfenvinfos), es un líquido incoloro con un ligero aroma. Las preparaciones comerciales más comunes de los insecticidas que se vendían en el pasado contenían 90% de clorfenvinfos. En la mayoría de los casos el clorfenvinfos se utilizaba en su forma líquida. Esta sustancia se mezcla fácilmente con la acetona, el etanol y el glicol de propileno. Se descompone lentamente con el agua y tiene acción corrosiva en los metales.

También conocido con el nombre sistemático (IUPAC) de O, O-Dietil-o-{2-cloro-1-(2, 4-diclorofenil) vinil} fosfato además por los nombres comerciales de Birlane; Dermatón; Sapercon; Steladone; Supona.

El efecto principal del clorfenvinfos es sobre el sistema nervioso. La ingestión de grandes cantidades puede causar náusea y vómitos, calambres estomacales, diarrea, dificultad para respirar y desmayo.

Cantidades menores pueden causar dolores de cabeza, mareo, debilidad, confusión, secreción nasal y visión borrosa. Estos síntomas pueden manifestarse dentro de 30-60 minutos y pueden ser máximos después de 6-8 horas.

No hay ninguna evidencia de que la exposición de larga duración a pequeñas cantidades de clorfenvinfos cause efectos nocivos en seres humanos.

No se sabe si el clorfenvinfos puede afectar la reproducción o puede causar defectos de nacimiento en seres humanos. Un estudio en animales observó disminución de fertilidad en ratas a las que se administró clorfenvinfos en la comida, y otro estudio observó que el clorfenvinfos interfirió con el desarrollo de ratas cuando se dio clorfenvinfos a los animales preñados ^[14].

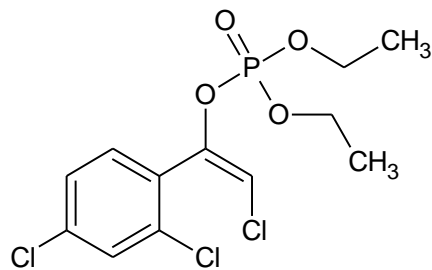


Figura 6. Estructura del Clorfenvinfos.

- **Diclorvos (Dichlorvos)**

Insecticida en forma de líquido denso incoloro. Tiene aroma algo dulce y se mezcla fácilmente con agua. Para controlar plagas, el diclorvos se diluye con otras sustancias químicas y se usa en forma de aerosol. También puede incorporarse a plástico para liberación lenta.

El diclorvos se usa para controlar insectos en áreas de almacenamiento de alimentos, invernaderos y graneros y para el control de insectos en ganado. Generalmente no se usa en cosechas abiertas. A veces se usa diclorvos para controlar insectos tanto en el hogar como en lugares de trabajo. Los veterinarios usan diclorvos para controlar parásitos en animales domésticos.

También es conocido con el nombre sistemático (IUPAC) de 2, 2-Dicloroetenil dimetil fosfato además por los nombres comerciales de Astrobat; Atgard; Canogard; Dede vap; Dichlorman; Divipan; Doom; Equigard; Equigal; Estrosol; Herkol; Nogos; Nuvan; Prosvit; Task; Vapona; Verdisol.

El efecto principal del diclorvos es sobre el sistema nervioso. Estudios en gente expuesta a diclorvos al respirar aire contaminado con bajos niveles de diclorvos en el trabajo no han demostrado ningún efecto nocivo. Estudios en animales han

demostrado que respirar niveles altos de diclorvos puede producir efectos en el sistema nervioso.

Ingerir grandes dosis puede causar náusea y vómitos, agitación, sudor y temblores musculares, mientras que dosis muy altas puedan inducir coma, inhabilidad para respirar y la muerte. Estudios en animales también han demostrado efectos sobre el sistema nervioso cuando los animales tomaron agua o comieron comida que contenía diclorvos.

No se sabe si el diclorvos puede afectar la reproducción o si produce defectos de nacimiento en seres humanos.

Estudios en animales no han observado efectos sobre la reproducción o defectos de nacimiento a raíz de exposición a diclorvos.

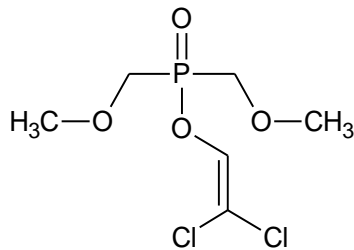


Figura 7. Estructura del Diclorvos

- **Etión (Ethion)**

Plaguicida organofosforado. El etiión puro es un líquido incoloro a amarillento con un olor desagradable parecido al azufre. No ocurre en forma natural en el medio ambiente.

El etiión es usado en agricultura principalmente para controlar insectos en árboles de frutas cítricas (limones, naranjas, etc.), aunque también se usa en algodón, en árboles frutales y de nueces, y en ciertas hortalizas. También puede usarse en céspedes y prados, pero no se usa para controlar insectos en el hogar.

También es conocido con el nombre sistemático (IUPAC) de O, O, O', O'-tetraetil S, S'-metilen bis (fosforoditioato) además por los nombres comerciales de Rhodocide 500; Acahion; Ethion 500 Ce ^[17].

El etiión afecta al sistema nervioso. La exposición a altas cantidades de etiión puede producir náusea, sudor, diarrea, pérdida del control de la vejiga, visión borrosa, temblores musculares y dificultad para respirar. La intoxicación grave puede producir coma, incapacidad para respirar y la muerte ^[14].

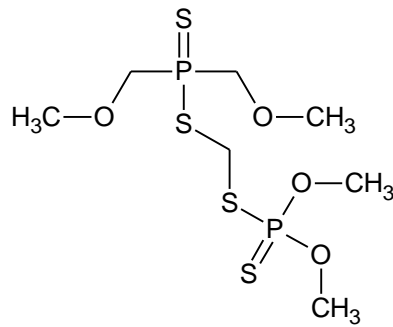


Figura 8. Estructura del Eti6n

5.1.2.2 *Plaguicidas organoclorados*

Eran de uso com6n en el pasado, pero muchos han sido retirados del mercado debido a su salud y el medio ambiente y su persistencia.

Muchos plaguicidas contienen cloro. Algunos ejemplos notables son: DDT, dicofol, heptacloro, endosulf6n, clordano, aldr6n, dieldr6n, endrina, mirex y pentaclorofenol. Estos pueden ser hidrof6licos o hidrof6bicos en funci6n de su estructura molecular. Muchos de estos agentes han sido prohibidos en varios pa6ses, por ejemplo, mirex y aldr6n ^[18].

Los insecticidas organoclorados no tienen una estructura b6sica debido a que tiene variaciones muy diferentes que pueden tener estos compuestos entre s6.

Los organoclorados contribuyen a muchas enfermedades cr6nicas. Entre los posibles s6ntomas de un envenenamiento agudo, est6n los temblores, el dolor de cabeza, irritaci6n de la piel, problemas respiratorios, mareos, nausea y convulsiones.

Los organoclorados tambi6n est6n asociados con muchas enfermedades cr6nicas. Las investigaciones han revelado una correlaci6n entre una exposici6n a estas sustancias y varias clases de c6ncer, da6os neurol6gicos (varios organoclorados son neurot6xinas), el mal de Parkinson, defectos de nacimiento, enfermedades respiratorias y anormalidades en el sistema inmunitario.

Muchos organoclorados son, o se sospecha que sean, interruptores endocrinos, e investigaciones recientes han demostrado que una exposici6n a concentraciones extremadamente peque6as en el vientre materno, puede causar da6os irreversibles a los sistemas inmunitario y reproductivo del feto ^[19].

Algunos plaguicidas organoclorados

- **Aldr6n y Dieldr6n (Aldr6n and Dieldr6n)**

Insecticidas con estructura qu6mica similar. Se discuten juntos porque el aldr6n se degrada r6pidamente a dieldr6n en el cuerpo y en el medio ambiente. El aldr6n y

dieldrín puros son polvos blancos con un leve olor a sustancia química. Los polvos comerciales de menor pureza tienen color canela. Ninguna de estas sustancias ocurre naturalmente en el ambiente.

Desde los 1950s hasta 1970, tanto el aldrín como el dieldrín se usaron ampliamente como pesticidas en cosechas tales como maíz y algodón. Debido a preocupaciones acerca de daño al ambiente y posiblemente sobre la salud pública, la EPA prohibió todos los usos de aldrín y de dieldrín en 1974, excepto para controlar termitas. En 1987, la EPA prohibió todos los usos.

El Aldrín – el Dieldrín también son conocidos con los nombres sistemáticos (IUPAC) de 1, 2, 3, 4, 10, 10-hexacloro-1, 2, 4 α , 5, 8, 8 α -hexahidro-1,4-endo,exo-5,8-dimetanonaftalina y 1, 2, 3, 4, 10, 10-hexacloro-6, 7-epoxi-1, 4, 4 α , 5, 6, 7, 8, 8 α -octahidro-1, 4-endo,exo-5, 8-dimetanonaftalina además por los nombres comerciales de Alderstan; Aldrex; Octalene; Dilstan EC-15 ^[13].

Personas que han ingerido intencionalmente o accidentalmente cantidades grandes de aldrín o de dieldrín han sufrido convulsiones y algunas fallecieron. Efectos sobre la salud también pueden ocurrir después de un período de exposición prolongado a cantidades menores porque estas sustancias químicas se acumulan en el cuerpo.

Algunos trabajadores expuestos por largo tiempo a niveles moderados en el aire experimentaron dolores de cabeza, mareo, irritabilidad, vómitos y movimientos musculares sin control. Los trabajadores que fueron removidos de la fuente de exposición se recuperaron rápidamente de la mayoría de estos efectos.

Los animales expuestos a cantidades altas de aldrín o dieldrín también sufrieron efectos del sistema nervioso. En animales, la exposición oral prolongada a niveles más bajos también afectó el hígado y disminuyó su capacidad para combatir infecciones. No sabemos si el aldrín o el dieldrín perjudican la capacidad de seres humanos para combatir enfermedades.

Los estudios en animales han proporcionado resultados contradictorios acerca de si el aldrín o el dieldrín perjudican la reproducción en machos o si estas sustancias químicas pueden dañar los espermatozoides. No sabemos si el aldrín o dieldrín perjudican la reproducción en seres humanos ^[14].

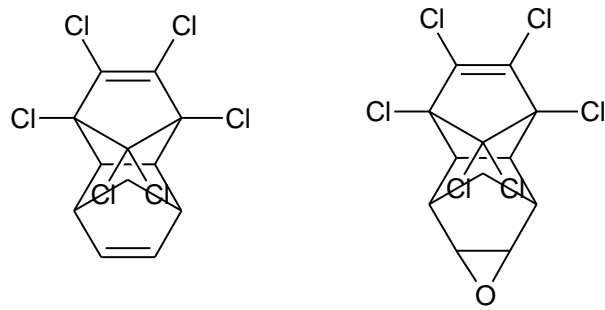


Figura 9. Estructuras del Aldrín y el Dieldrín

- **Endosulfán (Endosulfan)**

El endosulfán es un pesticida. Es un sólido de color crema a pardo que puede ocurrir en forma de cristales o escamas. Tiene un olor parecido a trementina, pero no se incendia. No ocurre en forma natural en el medio ambiente.

El endosulfán es usado para controlar insectos tanto en cosechas comestibles como no-comestibles, y también como preservativo para madera.

El Endosulfán también es conocido por el nombre sistemático (IUPAC) de 6, 7, 8, 9, 10, 10-hexacloro-1, 5, 5a, 6, 9, 9a-hexahidro-6, 9-metano-2, 4, 3-benzodioxatiepina-3-óxido además por los nombres comerciales de Malix; Thiodan; Thionex.

El endosulfán afecta al sistema nervioso central evitando que funcione en forma normal. En adultos expuestos a altos niveles de endosulfán se han observado hiperactividad, náusea, mareo, dolor de cabeza o convulsiones. La intoxicación seria puede causar la muerte.

Los estudios de los efectos del endosulfán en animales sugieren que la exposición prolongada puede también dañar los riñones, los testículos y el hígado y puede posiblemente afectar la habilidad del cuerpo para combatir infecciones. Sin embargo, no se sabe si estos efectos también ocurren en seres humanos.

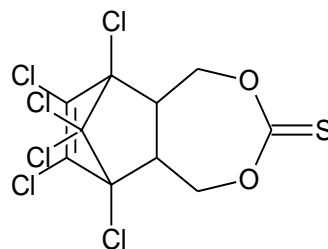


Figura 10. Estructura del Endosulfán

- **Tetradifón (Tetradifon)**

Sólido blanco cristalino, resistente a la hidrólisis por ácidos y álcalis y no es corrosivo.

El tetradifón se utiliza como acaricida no sistémico, que es tóxico para los huevos y adultos de una amplia gama de ácaros fitófagos. Se usa en la horticultura y en la silvicultura.

También es conocido con el nombre sistemático (IUPAC) de 4 – clorofenil – 2, 4, 5 – triclofenil sulfona, además por los nombres comerciales de Acaroil TD, Acarvin, Agrex T - 7.5, Akaritox, Aracnol K, Aredion, Mitifon, Mition, Polacaritox, Roztoczol, Roztozol, Tedion V-18, Tetradichlone, Tetranol V18.

La población general está expuesta al tetradifón principalmente por medio de los alimentos, pero los estudios hechos en productos de mercado han demostrado que, bajo índices normales de aplicación como acaricida, hay una ausencia virtual de residuos.

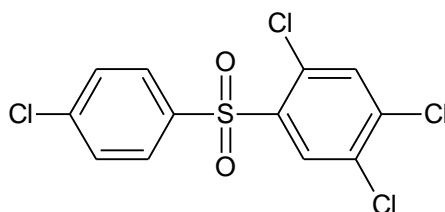


Figura 11. Estructura del Tetradifón

- **Heptacloro (Heptachlor)**

Sustancia química manufacturada que no ocurre naturalmente en el ambiente. El heptacloro puro es un polvo blanco que huele a alcanfor (bolas de naftalina). La forma de menor pureza es de color canela.

El heptacloro se usó extensamente en el pasado como plaguicida en viviendas, edificios y en cosechas de alimentos. Estos usos terminaron en el año 1988. Actualmente sólo puede usarse para el control de hormigas en transformadores bajo tierra.

Las bacterias y los animales degradan al heptacloro a epóxido de heptacloro. Es más probable encontrar epóxido de heptacloro que heptacloro en el ambiente.

También es conocido con el nombre sistemático (IUPAC) de 1, 4, 5, 6, 7, 8, 8-heptacloro-3a, 4, 7, 7a-tetrahidro-4, 7-metanoindano además por los nombres comerciales de Drinox; Heptamul; Velsicol 104 [13].

No hay información confiable acerca de los efectos de estas sustancias en seres humanos. En animales que ingirieron heptacloro se han observado daño del hígado, excitabilidad y disminución de la fertilidad. Los efectos son más severos cuando los niveles de exposición son altos o la exposición dura varias semanas.

Aunque hay muy poca información acerca del epóxido de heptacloro, probablemente produce efectos similares a los producidos por el heptacloro [14].

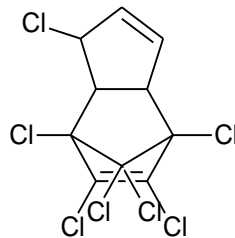


Figura 12. Estructura del Heptacloro

5.1.2.3 Carbamatos

Afectan el sistema nervioso por disupting una enzima que regula la acetilcolina, un neurotransmisor. Los efectos enzimáticos suelen ser reversibles. Hay varios subgrupos dentro de los carbamatos.

La estructura básica de los carbamatos es la siguiente:

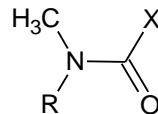


Figura 13. Estructura básica de carbamatos.

En donde R es H o un grupo metilo (CH₃) y X es un alcohol que determina el grado de acoplamiento al centro activo de las colinesterasas y por lo mismo, su capacidad inhibidora. Este alcohol usualmente es un grupo arilo, un heterocíclico o una oxima. La estructura química del carbamato es importante para predecir su grado de toxicidad [20].

Los grupos N-amino terminales de los residuos de valina en las cadenas α - β - de la deoxihemoglobina existen en forma de carbamatos. Esto ayuda a estabilizar a la proteína mientras se transforma en deoxihemoglobina y aumenta su tendencia a liberar el oxígeno remanente que aún se encuentra unido a la proteína. La influencia de estos carbamatos en la afinidad de la hemoglobina por el O₂ se denomina efecto Bohr.

Los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina en la ureasa y fosfotriesterasa también se presentan como carbamatos. El carbamato derivado del aminoimidazol

es un intermediario en la biosíntesis de la inosina. Se genera carbamil fosfato antes que CO₂ a partir de la degradación metanogénica del carboxifosfato [21].

Algunos carbamatos

- **Carbaril (Carbaryl)**

Compuesto químico empleado fundamentalmente como insecticida. Es un sólido blanco cristalino, descubierto en 1958, utilizado para la protección de jardines domésticos, agricultura comercial y silvicultura.

Ha sido clasificado como un potencial carcinógeno para los seres humanos por la United States Environmental Protection Agency (EPA). Es capaz de matar varios insectos beneficiosos y diversas especies de crustáceos junto con las plagas que combate, por lo que habrá de tenerse precaución a la hora de su aplicación, para no dañar a las especies no dañinas. El carbaril es, asimismo, un tóxico agudo para las abejas, y destruye las colonias de las mismas que se alimentan en zonas donde este pesticida haya sido aplicado [22].

También es conocido con el nombre sistemático (IUPAC) de 1-naftil metilcarbamato o Naftalen-1-ilN-metilcarbamato además por los nombres comerciales de Carylderm; Derbac (shampoo); Murvin; Sevin; Suleo-C.

El carbaril es un compuesto orgánico nocivo a las personas que están expuestas a este; los efectos directos pueden provocar dermatosis; malformaciones congénitas hasta una muerte por intoxicación.

También está comprobado que puede provocar visión borrosa, dificultad al respirar, debilidad, dolor de cabeza, salivación, ojos llorosos, contracción pupilar, sudoración excesiva, calambres abdominales, náuseas, vómitos, diarrea [23].

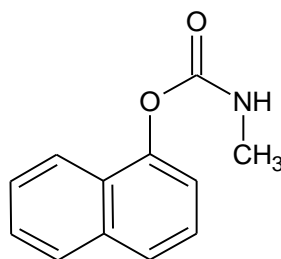


Figura 14. Estructura del Carbaril

- **Carbofurano (Carbofuran)**

Uno de los pesticidas de carbamato más tóxico. Es usado para el control de plagas de insectos en una abundante variedad de cultivos, que incluyen papa, maíz y soja. Es un insecticida sistémico, lo que significa que la planta lo absorbe

mediante las raíces, y que desde allí la planta lo distribuye al resto de sus órganos (principalmente vasos, tallos y hojas; no sus frutos), donde se alcanzan las mayores concentraciones del insecticida.

En mayo de 2009 la EPA canceló todas las tolerancias de alimentos, una acción que equivale a una prohibición de facto sobre su uso en todos los cultivos para el consumo humano [24].

También es conocido con el nombre sistemático (IUPAC) de 2, 2-dimetil-2, 3-dihidro-1-benzofuran-7-il metilcarbamato además por los nombres comerciales de Carbodan, Carbofurano, Carbugran, Crysfulan, Cufuran, Curater, Curator, Furacide, Furadan, Furazin, Maxul, Pillarfulan, Rimafuran, Sunfulan, Trigger [25].

El carbofurano tiene una de las más altas toxicidades agudas para los seres humanos de cualquier insecticida ampliamente usado en cultivos de campo (solamente aldicarb y paratión son más tóxicos). Un cuarto de cucharadita (1 ml) puede ser fatal. La mayoría del carbofurano es aplicado por aplicadores comerciales que utilizan sistemas cerrados con los controles diseñados para que no haya exposición a esta sustancia en la preparación. Ya que sus efectos tóxicos se deben a su actividad como inhibidor de la colinesterasa es considerado un plaguicidas neurotóxico.

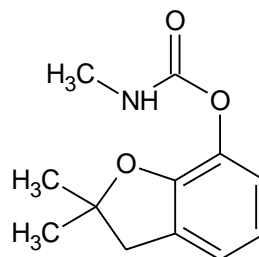


Figura 15. Estructura del Carbofurano

- **Metomilo (Methomyl)**

Insecticida carbamato con acción de contacto, estomacal y translaminar. Controla insectos chupadores y masticadores en hortalizas, cereales, maíz, forrajeras, frutales y vides (Viñas, Parronales y Uva de Mesa).

Polvo soluble, al 90%, insecticida carbónico, presentando acción sistémica, particularmente eficaz en control de larvas de lepidópteros y pulgones, actuando sobre huevos, larvas y adultos.

Fue introducido en 1966, pero su uso se halla restringido debido a su elevada toxicidad para los humanos. Se emplea especialmente en alfalfa para forraje.

También es conocido por el nombre sistemático (IUPAC) de S-metil (EZ)-N-(metilcarbamoiloxi) tioacetimidato además de los nombres comerciales de Gowan Methomyl 90 Ps; Lannate; Methomyl 90; Methomex [26].

Exposición excesiva puede producir inhibición de la colinesterasa del tipo organofosforado. Exposición repetida a pequeñas cantidades de metomilo puede causar inhibición insospechada de la colinesterasa, manifestándose en síntomas similares a los de la gripa. Los signos y síntomas de una exposición excesiva al metomilo pueden ser: dolor de cabeza, desvanecimiento, descoordinación, espasmos musculares, temblor, náuseas, calambres abdominales, diarrea, sudoración, contracción de la pupila, excesiva micción, convulsiones [27].

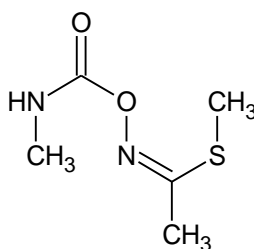


Figura 16. Estructura del Metomilo

- **Propoxur**

Insecticida no sistémico que se introdujo en 1959. Se utiliza contra los mosquitos en áreas al aire libre, las moscas en ambientes agrícolas, las pulgas y garrapatas en animales domésticos, como acaricida y en el césped para las hormigas. También se utiliza como un molusquicida, un producto químico que mata a los caracoles. Es eficaz contra las cucarachas, áfidos y saltamontes. Sustituyó al DDT en el control de moscas negras y mosquitos.

El propoxur es de la familia de insecticidas llamados carbamatos. Estos productos químicos bloquean la producción y la acción de la colinesterasa, una enzima esencial del sistema nervioso. Estos materiales paralizan rápidamente el sistema nervioso de los insectos, ganando ellos una reputación de tener un efecto rápido.

También es conocido por el nombre sistemático (IUPAC) de 2-isopropoxi-fenil metilcarbamato además de los nombres comerciales de Bay 9010; Baygon; Bayer 39007; Blattanex; Bolfo; BO Q 5812315; OMS 33; PHC (JMAF); Pillargon; UN Carbamate; Tugon; Unden; Undene [28].

Al igual que con otros compuestos de carbamato, el efecto inhibitor de la colinesterasa del propoxur es a corto plazo y reversible. Los síntomas de intoxicación por propoxur incluyen náuseas, vómitos, calambres abdominales, sudoración, diarrea, excesiva salivación, debilidad, desequilibrio, visión borrosa, dificultad para respirar, aumento de la presión sanguínea o hipertensión y la falta

de control de la orina o la liberación heces que se refiere como la incontinencia. La muerte puede resultar de un fallo del sistema respiratorio asociado con la exposición al propoxur. La recuperación completa de una intoxicación aguda por propoxur, sin efectos sobre la salud a largo plazo, es posible si la exposición cesa y la víctima tiene tiempo para reformar su nivel normal de la colinesterasa y para recuperarse de los síntomas [29].

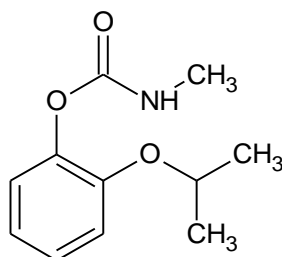


Figura 17. Estructura del Propoxur

5.2 TOXICOLOGÍA

Ciencia que estudia las sustancias químicas y los agentes físicos en cuanto son capaces de producir alteraciones patológicas a los seres vivos, a la par que estudia los mecanismos de producción de tales alteraciones y los medios para contrarrestarlas, así como los procedimientos para detectar, identificar y determinar tales agentes y valorar su grado de toxicidad.

En el último siglo la toxicología se ha expandido, asimilando conocimientos de varias ramas como la biología, la química, la física y las matemáticas [30].

5.2.1 Categorías toxicológicas de los plaguicidas

Los plaguicidas se clasifican según el grado de peligrosidad, entendiéndose éste como su capacidad de producir daño agudo a la salud cuando se dan una o múltiples exposiciones en un tiempo relativamente corto. Las categorías establecidas en Colombia se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Categorías toxicológicas, vías de ingestión y DL₅₀

Bandas de color	Categoría toxicológica	Toxicidad	Vía de ingreso, estado físico y DL ₅₀ *			
			Oral		Dérmico	
			Sólido	Líquido	Sólido	Líquido
	I	Extremadamente	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
	II	Altamente	5 – 50	20 – 200	10 – 100	40 – 400
	III	Moderadamente	50 – 500	200 – 2000	100 – 1000	400 – 4000
	IV	Ligeramente	> 500	> 2000	> 1000	> 4000

* Determinado en ratas (mg del compuesto/kg de peso corporal).

Esta es la clasificación exclusiva y vigente para plaguicidas que determinó el Ministerio de la Protección Social de Colombia en el decreto número 1843 de julio 22 de 1991, debido al amplio espectro de acción, comprobada persistencia y residualidad, además de los efectos adversos que genera sobre la salud^[31].

Actualmente en el país, los plaguicidas que causan mayor morbimortalidad son los organoclorados, organofosforados y carbamatos. Estos se relacionan con el número de brotes de intoxicación, inadecuado modo de producción, inapropiada manipulación y disposición de sus residuos^[32].

5.2.2 Bioacumulación y biomagnificación de plaguicidas

Algunos plaguicidas tienen estructuras químicas muy estables y tardan años en descomponerse a formas menos tóxicas. Otros se descomponen en otras sustancias con igual, o incluso mayor, peligrosidad. En muchos casos, estos productos no son fácilmente eliminados de los organismos debido a su baja solubilidad en agua y a la tendencia que tienen a acumularse en los tejidos grasos. De esta forma, un plaguicida que se encuentre en concentraciones muy bajas en el entorno, puede concentrarse en niveles importantes en distintos tejidos de animales, en un proceso que se conoce como biacumulación. Un caso particular de biacumulación es la biomagnificación; se trata de la trasmisión de agentes fitosanitarios exógenos bioacumulados a lo largo de la cadena alimenticia, de forma que las concentraciones de estos aumentan progresivamente a medida que asciende la cadena trófica, viéndose afectados con mayor intensidad los individuos situados en los niveles superiores de la misma^[33].

5.2.3 Toxicología forense

Es la rama de toxicología que estudia los métodos de investigación médico-legal en los casos de envenenamiento y muerte. Muchas sustancias tóxicas no generan ninguna lesión característica, de tal manera que si se sospecha alguna reacción tóxica, la investigación visual no sería del todo suficiente para llegar a una conclusión.

También podemos decir que la toxicología forense es rama de la medicina forense que estudia las sustancias químicas y venenos relacionados con delitos.

5.2.3.1 Origen de los plaguicidas

- **Vegetal** (Morfina, atropina, nicotina). Como algunas plantas venenosas. La mayoría de las plantas medicinales contienen sustancias tóxicas que son venenos a determinadas concentraciones, como por ejemplo la cicuta.
- **Animal** (Venenos de serpientes, abejas escorpiones, epinefrina)
- **Mineral** (Arsénico, mercurio, plomo)
- **Sintético** (Sustancias sintetizadas por el hombre en la industria como barbitúricos, tranquilizantes, pesticidas)^[34].

5.3 LEGISLACIÓN

En Colombia, el tema de los plaguicidas está regulado por diferentes instituciones a nivel nacional a través de decretos, normas, leyes, resoluciones, acuerdos y artículos, los cuales son los siguientes, extraídos del decreto 1843 de 1991^[35] y las resoluciones citadas en la tabla 2:

Artículo 188: De la coordinación. El Ministerio de Salud coordinará los planes de vigilancia para que sean ejecutados armónicamente por las entidades responsables: Servicios Seccionales de Salud, Instituto Colombiano Agropecuario, Instituto Nacional de Recursos Naturales Renovables y del Ambiente y demás Organismos del Estado que intervengan en la vigilancia epidemiológica y control sanitario de plaguicidas, o cuya participación se requiera como apoyo para el efectivo cumplimiento del presente Decreto. Los demás Organismos del Estado deberán participar en forma activa, dar respaldo y prestar apoyo permanente al tenor de lo establecido en esta norma, para el cumplimiento de la misma y disposiciones complementarias.

Artículo 189: De la responsabilidad. Los Servicios Seccionales de Salud y las respectivas Regionales del Instituto Colombiano Agropecuario, serán responsables de la coordinación con otras entidades oficiales y privadas de la aplicación de las disposiciones en materia de vigilancia y control en el uso y manejo de plaguicidas.

Artículo 190: De la asesoría. El Ministerio de Salud a través de la Divisiones de Control de Accidentes y Salud Ocupacional y de Programas Sanitarios Especiales y el Instituto Colombiano Agropecuario a través de las Divisiones de Insumos agrícolas y Pecuarios, asesoran en el área de su competencia, a los Servicios Seccionales de Salud y Regionales correspondientes del Instituto Colombiano Agropecuario, respectivamente, sobre aplicación de normas en el uso y manejo de plaguicidas.

Artículo 191: Del programa para prevención. Toda persona natural o jurídica que se dedique a actividades de uso y manejo de plaguicidas deberá tener un programa completo para prevención y tratamiento de casos de emergencia para ser aplicado por personal debidamente capacitado. Este programa deberá ser sometido a la aprobación y control del Servicio Seccional de Salud correspondiente.

Artículo 192: De la obligación de difundir las Normas. La legislación y demás normas sobre uso y manejo de plaguicidas, así como cualquier información que se tenga al respecto, deberán difundirse con oportunidad y amplitud a los Servicios Seccionales de Salud, Regionales del Instituto Colombiano Agropecuario y a las demás entidades involucradas en aspectos atinentes a plaguicidas.

Artículo 193: De las facultades de las Autoridades sobre vigilancia y control. Para fines de vigilancia epidemiológica y control sanitario y ambiental, en uso y manejo de plaguicidas, las Autoridades Sanitarias tendrán derecho a libre acceso en cualquier día y hora al lugar, vehículo, edificación o producto donde se usen o manejen plaguicidas.

Tabla 2.Resoluciones vigentes para el control de plaguicidas en Colombia^[36].

Ley, resolución, decreto o acuerdo #	Año de emisión	Entidad que emite	Objeto de la norma
R – 447	1974	Ministerio de Agricultura	Prohíbe el uso y venta de plaguicidas clorados para el cultivo de tabaco.
R – 2189	1974	Instituto Colombiano Agropecuario ICA	Cancela registro de fungicidas a base de compuestos de mercurio.
R – 1042	1977	Instituto Colombiano Agropecuario ICA	Cancela registro de plaguicidas a base de leptophos (Phosvel).
R – 209	1978	Ministerio de Agricultura	Prohíbe el uso de plaguicidas organoclorados en el cultivo del cafeto.
Ley 9	1979	Congreso de la Republica	Establece las normas generales que sirven de base a las disposiciones y reglamentaciones emitidas para preservar, restaurar y mejorar las condiciones sanitarias en lo que se relaciona a la salud humana. Incluye normas generales sobre la producción, formulación, almacenamiento, distribución, movilización y aplicación aérea de los plaguicidas.
R – 749	1979	Instituto Colombiano Agropecuario ICA	Cancela registro de venta de productos a base de 2, 4,5-T y 2, 4,5-TP.
R – 243	1982	Instituto Colombiano Agropecuario ICA	Prohíbe la producción, importación y venta de plaguicidas a base de Dibromocloropropano (DBCP).
R – 1158	1985	Instituto Colombiano Agropecuario ICA	Prohíbe la producción, importación y venta de plaguicidas a base de Dibromuro de etileno (EBD).
R – 1849	1985	Instituto Colombiano Agropecuario ICA	Prohíbe la producción, importación y venta de plaguicidas a base de Endrin.
D – 704	1986	Presidencia de la Republica	Prohíbe el uso de DDT, sus derivados y compuestos.
R – 930	1987	Instituto Colombiano Agropecuario ICA	Prohíbe la producción, importación y venta de plaguicidas a base de Dinoseb.
R – 19408	1987	Ministerio de Salud	Prohíbe el uso y manejo de los plaguicidas a base de Clordimefon y sus sales.
D – 305	1988	Presidencia de la Republica	Prohíbe la importación, producción y formulación de plaguicidas a base de aldrín, heptacloro, dieldrín, clordano y canfecloro.

Continuación tabla 2. Resoluciones vigentes para el control de plaguicidas en Colombia^[36].

Ley, resolución, decreto o acuerdo #	Año de emisión	Entidad que emite	Objeto de la norma
R – 47	1988	Instituto Colombiano Agropecuario ICA	Cancela la licencia de venta de plaguicidas que contienen clordimeform en su composición.
R – 3028	1989	Instituto Colombiano Agropecuario ICA	Prohíbe la aplicación por vía aérea en el territorio nacional de los herbicidas que contiene Paraquat.
R – 4863	1989	Instituto Colombiano Agropecuario ICA	Cancela licencia de venta correspondiente al fungicida de uso agrícola denominado Dithane M-22 (Maneb).
R – 5052	1989	Instituto Colombiano Agropecuario ICA	Cancela licencias de venta a los plaguicidas de uso agrícola denominados Manzate D y Manzate.
R – 5053	1989	Instituto Colombiano Agropecuario ICA	Prohíbe la importación, producción y venta de plaguicidas que contengan en su composición el ingrediente activo Captafol.
R – 2308	1990	Instituto Colombiano Agropecuario ICA	Prohíbe la importación, producción, venta y aplicación en el territorio nacional de los fungicidas que contengan Terbuconazol.
D – 1843	1991	Ministerio de Salud	Reglamenta parcialmente los títulos III, V, VI, VII y XI de la Ley 9 de 1979 sobre uso y manejo de plaguicidas con el objeto de evitar que afecten la salud de la comunidad, la sanidad animal y vegetal o causen deterioro al medio ambiente.
R – 2156	1991	Instituto Colombiano Agropecuario ICA	Cancela las Licencias de Venta de los insecticidas a base de LINDANO.
R – 2471	1991	Instituto Colombiano Agropecuario ICA	Restringe los usos de PARATHION, únicamente a plagas de algodón y pastos tecnificados y del METIL PARATHION únicamente a plagas del algodón y arroz tecnificado.
R – 29	1992	Instituto Colombiano Agropecuario ICA	Prohíbe el uso de insecticidas para uso agrícola a base de Fonofos.
R – 9913	1993	Ministerio de Salud	Prohíbe la importación, producción y aplicación de los Fungicidas Maneb, Zineb y sus compuestos relacionados.
R – 10255	1993	Ministerio de Salud	Prohíbe la importación, producción, formulación, comercialización, uso y manejo de los siguientes productos: DIELDRÍN, CLORDANO, DODECACLORO o MIREX, PENTACLOROFENOL, DICOFOL, DDT, BHC HEPTACLORO, LINDANO y sus compuestos relacionados usados contra la broca del café.
R – 138	1996	Ministerio de Salud	Prohíbe la importación, fabricación, comercialización y uso de los plaguicidas con base en Bromuro de Metilo, solo o en combinación.

Continuación tabla 2. Resoluciones vigentes para el control de plaguicidas en Colombia^[36].

Ley, resolución, decreto o acuerdo #	Año de emisión	Entidad que emite	Objeto de la norma
R – 1669	1997	Ministerio de Salud	Por la cual se autoriza el uso de productos con base en ENDOSULFAN únicamente para el control de la broca del cafeto (<i>Hipotenemus hampei</i>).
R – 1559	1999	Instituto Colombiano Agropecuario ICA	Por la cual se cancela el registro de venta No. 0852 correspondiente al insecticida biológico denominado DIPEL WP.
R – 1312	2001	Instituto Colombiano Agropecuario ICA	Cancela registro de venta del producto Thionex 35 EC, formulado a base de endosulfán.
R – 1681	2002	Instituto Colombiano Agropecuario ICA	Suspender el registro de venta de los productos TESS 50 EW (deltametrin) y LARVIN 375 SC (tiodicarb).
R – 1973	2004	Instituto Colombiano Agropecuario ICA	Por la cual se cancela registro de venta al fungicida Benlate WP a base de Benomyl.
R – 1756	2006	Instituto Colombiano Agropecuario ICA	Por el cual se adopta el manual de procedimientos de regulación y control de plaguicidas químicos de uso agrícola.
R – 2906	2007	Ministerio de Protección Social	Establece los Límites Máximos de Residuos de Plaguicidas -LMR- en alimentos para consumo humano y en piensos o forrajes.
R – 228	2007	Instituto Colombiano Agropecuario ICA	Por el cual se establecen obligaciones sobre la desnaturalización, almacenamiento y disposición final de desechos peligrosos e insumos agrícolas.
R – 4754	2011	Instituto Colombiano Agropecuario ICA	Por la cual se establecen requisitos para ampliación de uso de plaguicidas químicos de uso agrícola en cultivos menores.
R – 5469	2012	Instituto Colombiano Agropecuario ICA	Por el cual se establecen los requisitos para otorgar el registro de importador de plaguicidas de uso agrícola para uso directo.

5.4 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN

5.4.1 Extracción líquido – líquido

Es un proceso de separación de los componentes en una solución mediante su distribución en dos fases líquidas inmiscibles. Esta operación unitaria se basa en las diferencias de solubilidad de los componentes de la mezcla en un solvente dado y consiste en la separación de los constituyentes de una disolución líquida por contacto de otro líquido inmiscible que disuelve preferentemente a uno de los constituyentes de la disolución original, dando lugar a la aparición de dos capas líquidas inmiscibles de diferentes densidades.

La extracción líquido – líquido se utiliza principalmente cuando la destilación no es práctica o su empleo es demasiado costoso, los casos más frecuentes de su empleo se presentan cuando sus componentes a separar pueden ser sensibles a la temperatura, siendo la destilación un proceso ineficaz. Es por esto que la extracción líquido – líquido puede presentar ventajas sobre ejecutar una separación por destilación.

5.4.1.1 *Matriz biológica utilizada para el estudio de plaguicidas en el cuerpo (sangre)*

Generalmente se remite al laboratorio sangre entera. Esta debería extraerse de venas externas al tracto gastrointestinal como la vena femoral.

La cantidad de sangre necesaria para el análisis cualitativo es de 2 mL, para el estudio por esta metodología. Sin embargo es deseable que sean tomados unos cuantos mililitros más para ulteriores repeticiones y resguardo para posible repeticiones como contraprueba solicitadas por la judicatura.

5.5 CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG)

En la actualidad la cromatografía de gases es el método más aceptado y se encuentra avalado por las publicaciones científicas internacionales.

La cromatografía es una familia de técnicas de separación de los componentes presentes en una muestra. La técnica se basa en la diferencia de distribución de la muestra en dos fases, estacionaria y otra llamada fase móvil. En la cromatografía de gases, la fase móvil es un gas que es el gas portador que consta de moléculas de bajo peso molecular, inertes y de alta pureza. Las principales partes del cromatógrafo de gases son:

- Inyector: Sistema usado para introducir la muestra al cromatógrafo
- Columna: Elemento en el que se da la separación de los componentes de la muestra inyectada al cromatógrafo de acuerdo a las condiciones preestablecidas o método de análisis
- Sistema de datos: Básicamente un computador que traduce las señales respuesta en un lenguaje gráfico dando como resultado un cromatograma.

La cromatografía de gases es un método de separación de mezclas de sustancias de interés analítico. La separación se lleva a cabo en una columna que contiene una fase estacionaria sólida la cual se mantiene a una temperatura controlada por un horno y a un flujo constante de un gas portador (fase móvil). Cuando se inyecta una mezcla, cada componente migra hacia el detector repartiéndose durante su trayecto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Las moléculas de mayor afinidad a la fase estacionaria permanecen más tiempo en esta fase y por lo tanto tardan más en llegar al detector. El detector produce una señal, la cual es procesada por un integrador y registrada en un papel. Cada sustancia que pasa por la columna

tiene un tiempo de retención característico el cual se define como el tiempo en minutos desde la inyección hasta el pico máximo captado por el detector.

5.5.1 Análisis de datos cromatográficos

En la cromatografía de gases un resultado es positivo cuando cada compuesto separado de la muestra presenta igual tiempo de retención que la sustancia de referencia y este tiempo de retención no difiere en 0,2 unidades del estándar.

La óptima separación depende de dos factores: tipo de columna y condiciones de funcionamiento o método. El tiempo que transcurre entre el momento de la inyección de la muestra y la aparición de cada componente se denomina tiempo de retención para cada uno (t_R) de acuerdo al método implementado, estandarizado y validado^[34].

5.5.2 Detector de espectrometría de masas

La Espectrometría de Masas es una poderosa técnica micro analítica usada para identificar compuestos desconocidos, para cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas. La detección de compuestos puede ser llevada a cabo con cantidades realmente pequeñas de muestra y obtener información característica como el peso y algunas veces la estructura del analito.

En todos los casos, alguna forma de energía es transferida a las moléculas a analizar para afectar la ionización. En la técnica clásica de impacto electrónico, algunas de las moléculas ionizadas del analito “explotan” en una variedad de fragmentos ionizados, el patrón de fragmentación resultante así como los iones residuales constituyen el espectro de masas. En principio, el espectro de masas de cada compuesto es único y puede ser usado como se “huella química” para caracterizar el analito ^[37].

5.6 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de un método analítico se define como un proceso de evaluación sistemático para demostrar que el método cumple con los requisitos necesarios para el uso que se le va a otorgar, estos requisitos se traducen de manera práctica en la determinación de una serie de parámetros de desempeño analítico.

La validación implica que el comportamiento del método se conoce y que se puede evaluar la incertidumbre en el valor obtenido, de modo que el usuario puede estar seguro del grado de confianza que pueda tener el resultado. Esta debería aplicarse cuando se requiere incorporar una técnica nueva al trabajo de rutina del laboratorio, también cuando se comparan dos metodologías o bien cuando se está desarrollando un método o técnica nuevos.

Los métodos analíticos deben ser validados mediante pruebas de laboratorio: "Validación de un procedimiento analítico es el proceso mediante el cual se establezca, mediante estudios de laboratorio, que las características de funcionamiento del procedimiento de cumplir con los requisitos para las aplicaciones de análisis previstos". Las pruebas de laboratorio necesarios para la validación del método se han definido en diferentes grupos de trabajo de los comités nacionales e internacionales^[38].

5.7 PARÁMETROS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO

5.7.1 Selectividad

Es la capacidad de un método analítico para medir y/o identificar los analitos de interés, en presencia de otras sustancias químicas que se encuentren presentes en una muestra.

El estudio de la selectividad es uno de los parámetros de mayor importancia dentro de la validación de un método analítico.

La selectividad permite distinguir posibles especies químicas existentes o que puedan generarse como interferencia. Para un método de control de calidad de rutina se podría aceptar si ésta interferencia es conocida y de magnitud aceptable.

5.7.2 Linealidad y Rango

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analitos en la muestra dentro de un rango establecido.

El rango se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior del analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito.

Para evaluar la linealidad existen unos criterios mínimos aplicables a cualquier procedimiento:

- Dentro del rango establecido se recomienda estudiar al menos 5 niveles de concentración y analizarlas por triplicado, se establece como criterio práctico analizarlas en sentido creciente de concentración para minimizar posibles efectos memoria en el equipo.
- Las muestras a analizar se deben preparar a partir de estándares de analito de concentración conocida. Este estudio de linealidad puede servir también para evaluar la exactitud del método.
- El número de repeticiones de cada muestra dependerá de la precisión del sistema instrumental empleado.

Como resultados del estudio de la linealidad se prepara una tabla relacionando las concentraciones X y la respuesta Y en este caso áreas. La relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo $y=b*x+a$ obtenida por un método de ajuste.

5.7.3 Precisión

Expresa el grado de concordancia entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas.

El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad del método de ensayo.

La precisión engloba diferentes tipos de estudios:

- **Repetitividad:** Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas, en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.
- **Precisión intermedia:** Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en condiciones operativas diferentes y en un mismo laboratorio.
- **Reproducibilidad:** Estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios.

La precisión de un método analítico se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV).

5.7.4 Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado.

5.7.5 Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

Se entiende por límite de cuantificación (LC) de dicho método, la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud; y por límite de detección (LD) la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales.

El límite de cuantificación es por tanto un término cuantitativo mientras que el límite de detección es sólo cualitativo.

Una alta sensibilidad del método analítico no siempre permite suponer inferiores límites de cuantificación y de detección, ya que lo que definirá estos límites es la relación entre el ruido y la señal debida al analito.

5.8 IDONEIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Consiste en un conjunto de ensayos que permiten comprobar en el momento de utilización del método, que el sistema es adecuado para llevar a cabo la determinación para la que se ha establecido y validado dicho método.

El test de idoneidad del sistema debe encontrarse vinculado de forma directa a las características del método analítico para el que se estableció, ya que debe reflejar su viabilidad en el momento de emplearlo.

5.8.1 Parámetros cromatográficos

5.8.1.1 *Factor de capacidad*

Se interpreta como el número de volúmenes de fase móvil necesarios para eluir un compuesto después del volumen inicial contenido en la columna, este factor determina la retención de un soluto.

5.8.1.2 *Numero de platos teóricos*

Es una medida de la eficacia del sistema cromatográfico, que expresa el número de picos que pueden aparecer en el cromatograma por unidad de tiempo. El número de platos teóricos depende del tiempo de elución, se recomienda que sea superior a 2000.

5.8.1.3 *Factor de asimetría*

El factor de asimetría o de cola es una medida de la asimetría de la señal generada por el analito. Un pico perfectamente simétrico tendrá un factor de cola de 1.0. Un pico que presente un ensanchamiento por el inicio del pico tendrá valores inferiores a la unidad.

Como norma general el factor de asimetría debería encontrarse entre 0.8 y 1.5, aunque pueden aceptarse valores de hasta 2.0.

5.8.1.4 *Resolución*

Es la medida de la separación entre dos picos. Resulta muy útil para controlar el comportamiento de posibles interferencias.

Se entiende como resolución a línea de base obtenida cuando la señal correspondiente a las últimas trazas de analito llega a la línea de base antes de que las primeras trazas del siguiente analito en eluir sean detectadas ^[39].

5.9 VALOR PREDICTIVO

Mide la eficacia real de una prueba. Son probabilidades del resultado, es decir, dan la probabilidad de encontrar o no un compuesto una vez conocido el resultado de la prueba. Se trata de valores post-test y dependen de la prevalencia de un compuesto, es decir, del porcentaje de una sustancia que contenga este determinado compuesto.

6 METODOLOGÍA

La metodología presentada permite identificar diferentes pesticidas presentes en sangre utilizando como estándar interno el clorfenvinfos y el tetradifón.

6.1 UNIDAD EXPERIMENTAL

Se trabajaron soluciones etanolicas, metanolicas y diclorometanolicas (Sistema) y de sangre (Método) enriquecidas con clorpirifós, malatión, metilparatión, dimetoato, diclorvos, etión, aldrín, endosulfán, heptacloro, carbaril, carbofurano, metomilo y propoxur de concentraciones conocidas, utilizando clorfenvinfos y tetradifón como estándar interno. Se preparan las soluciones en el Laboratorio de Toxicología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la Regional Occidente.

Se utilizaron estándares de concentraciones que iban de 94 % hasta 99,5 % p/p.

6.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK Y ESTÁNDAR INTERNO

Se prepararon 100 mL de solución estándar interno a 1000 ppm (Partes por millón) tanto de clorfenvinfos como de tetradifón, también se preparan 50 mL de cada uno de los pesticidas a analizar a 1000 ppm, todas estas soluciones se rotulan y se almacenan a 2 °C, y son realizados en medios metanolicos, etanolicos y diclorometanolicos.

6.3 PREPARACIÓN DE NIVELES PARA LA CURVA A PARTIR DE SOLUCIONES STOCK

Se utilizaron cinco niveles en la mayoría de los casos, se rotulan y se almacenan a una temperatura de 2 °C.

6.4 DETERMINACIÓN DE VOLUMEN DE EXTRACCIÓN

Se prepararon 50 mL de muestra en sangre a 50 ppm de una mezcla de pesticidas a analizar.

Se tomaron 2 mL de muestra a 50 ppm y se mezclan en un erlenmeyer con una solución extractora que contiene hexano, acetona y diclorometano en una proporción de 6:2:2 respectivamente, esto se hace en nueve erlenmeyer con la diferencia de que en cada uno va aumentando el volumen de la solución extractora que va desde 2 mL hasta 10 mL; estos erlenmeyer se dejan en una agitación de 2 horas.

Después de la agitación se filtran cada uno de los contenidos de los erlenmeyer por gravedad con papel de filtro el cual contiene Florisil y sulfato de sodio en poca cantidad, los cuales tiene una función de separación de grasas y secuestrante de agua.

El filtrado se recoge en viales de 10 mL debidamente rotulados con la cantidad de solución extractora utilizada para poder diferenciarlos entre sí; estos viales se dejan en la parte superior de una cabina de extracción alejado de otros compuestos para evitar una contaminación cruzada, este secado se lleva a cabo por un periodo de 18 horas.

Pasado este tiempo, el contenido de los viales es reconstituido con 110 μ L de hexano, se agita en un vortex por alrededor de 3 minutos y el contenido resultante se transfiere a un vial con inserto para su posterior análisis en el cromatógrafo de gases.

6.5 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EVALUAR EN EL CROMATÓGRAFO DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Se prepararon 50 mL de muestra en sangre a 100 ppm de cada uno de los pesticidas a analizar para realizar su reconocimiento por medio de sus iones seleccionados y tiempo de retención.

Se tomaron 2 mL de muestra a 100 ppm y se mezclan en un erlenmeyer con 6 mL de solución extractora la cual está compuesta por hexano, acetona y diclorometano a una relación de 6:2:2 respectivamente y se dejan agitando por un periodo de dos horas (Ver figura 18).



Figura 18. Mezcla de muestra con solución extractora compuesta por hexano, acetona y diclorometano.

Posteriormente se filtra la mezcla por medio de gravedad con papel filtro el cual contiene en su interior un poco de Florisil para atrapar los contenidos grasos que pueda contener la sangre tratada y sulfato de sodio para extraer el agua que contiene tanto la muestra como la solución extractora (Ver figura 19).

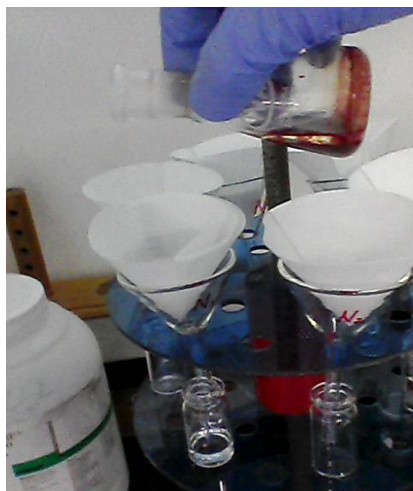


Figura 19. Filtrado de la mezcla

Este filtrado es recogido en un vial de vidrio de 10 mL el cual se deja secando por un periodo de 18 horas (Ver figura 20), el cual es dejado en una campana de extracción debidamente marcado y alejado de otros compuestos los cuales sus vapores pueda contaminar o viceversa (contaminación cruzada).

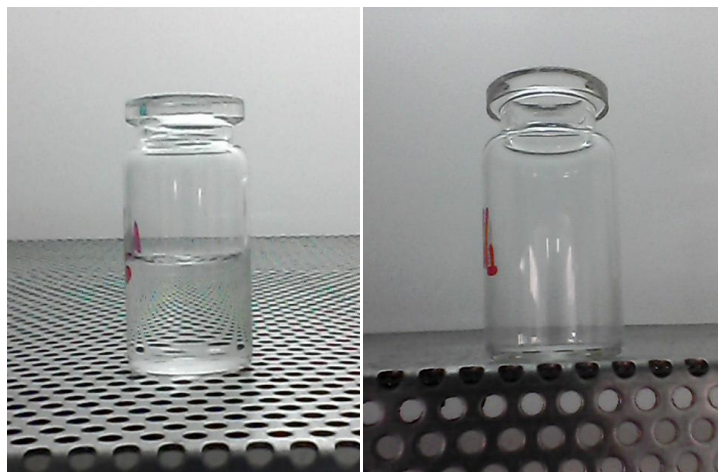


Figura 20. Secado de la mezcla

Por último se reconstituye con 110 μL de hexano, se agita en un vortex por unos 3 minutos, se transfiere a un vial con inserto y se coloca en el cromatógrafo de gases para su posterior análisis.



Figura 21. Cromatógrafo de gases (GC) Agilent Technologies 7890A acoplado a espectrómetro de masas cuadrupolo Agilent Technologies 5975C

6.6 PREPARACIÓN DE MEZCLAS PARA DETERMINAR LA IDONEIDAD DEL MÉTODO

Se preparan 50 mL de una mezcla de pesticidas en sangre a 100 ppm para su análisis.

Se realiza todo el proceso de extracción y se analiza posteriormente en el cromatógrafo.

6.6.1 Estabilidad

Se preparan 25 mL de una mezcla de pesticidas en sangre a 150 ppm, se almacena de uno a cinco días a 2 °C, debidamente rotulado.

Se realiza todo el proceso de extracción y se analiza posteriormente en el cromatógrafo incluyendo muestras almacenadas desde algunos años atrás.

6.7 PRECISIÓN INTERMEDIA

Se preparan 50 mL de una mezcla de pesticidas a 50 ppm y 100 ppm por dos diferentes analistas, se almacenan por un periodo de tiempo de una semana correctamente rotuladas las diferentes mezclas a una temperatura cercana a 2 °C y en el transcurso de esa semana, se realiza todo el proceso de extracción por los dos analistas y se analizan posteriormente en el cromatógrafo.

6.8 CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

A partir de las soluciones stock se realiza una curva de calibración con concentraciones de 100, 125, 150, 175, 200 ppm, utilizando clorfenvinfos como estándar interno, realizando tres replicas y haciendo el análisis cromatográfico y la estadística concerniente a la linealidad.

6.9 VALOR PREDICTIVO

Se preparan 50 mL de dos soluciones en sangre los cuales, solo uno contiene pesticidas a 100 ppm y el otro solamente es sangre.

Se les realiza todo el proceso de extracción a las dos soluciones, se ponen a analizar en el cromatógrafo y se realizan 20 veces por cada solución

6.10 VERIFICACIÓN DEL MÉTODO CON MUESTRAS REALES

Se tomaron cuatro muestras reales de personas diferentes, tanto en edad como de sexo, a estas muestras se les realiza todo el tratamiento de extracción y son analizadas por medio de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

6.11 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE RESULTADOS EXPERIMENTALES

6.11.1 Cálculos de idoneidad

- **Precisión**

Coeficiente de variación

$$CV (\%) = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

S: desviación estándar.

X: media aritmética de los resultados.

- **Factor de capacidad**

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

t_0 : tiempo en el que un compuesto no retenido pasa por el interior del sistema.

t_R : tiempo de retención del compuesto considerado.

- **Numero de platos teóricos**

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)$$

t_R : el tiempo de retención.

W: la anchura del pico en la línea de base determinado por la tangente ajustada a un % de la altura del pico.

- **Resolución**

$$R_S = C * \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_1 + W_2}$$

t_{R1} y t_{R2} : tiempo de retención (tiempo de elución del máximo del pico medido desde el inicio de la inyección), $t_{R1} < t_{R2}$.

C: constante cuyo valor varía según el criterio con el que se mida la anchura de pico.

W1 y W2: anchura del pico a media altura, $C=2$.

6.11.2 Linealidad

- **Ecuación de la recta. Pendiente y ordenada en el origen**

En la recta de regresión $y=b*x+a$, x es la concentración, y la respuesta, b el valor de la pendiente y, a el término independiente.

La pendiente b se encuentra relacionada con la sensibilidad del método de forma que a mayor pendiente mayor sensibilidad. El término independiente a , u ordenada en el origen, es la intersección de la recta con el eje de ordenadas y es indicativo del error sistemático.

- **Coefficiente de correlación**

Los puntos individuales sobre la línea se denotarán por (X_1, Y_1) , (X_2, Y_2) , (X_3, Y_3) ... (X_i, Y_i) ... (X_n, Y_n) , es decir, hay n puntos. La media de los valores de X , por lo general, se denomina \bar{X} y la media de los valores de Y , se denomina como \bar{Y} .

Para estimar si los puntos experimentales se ajustan bien o no a una línea recta, calculamos el coeficiente de correlación.

$$r = \frac{\sum(X - \bar{X})(Y - \bar{Y})}{\sqrt{\sum(X - \bar{X})^2 \sum(Y - \bar{Y})^2}}$$

Un minucioso estudio de esta ecuación muestra que r puede tomar valores en el intervalo de $-1 \leq r \leq +1$. Un valor de r de -1 describe una correlación negativa perfecta, es decir, todos los puntos experimentales están en línea recta de pendiente negativa. En forma similar, cuando $r = +1$, tenemos una correlación positiva perfecta, ya que todos los puntos están exactamente en una línea recta de pendiente positiva. Cuando no existe correlación entre x y y , el valor de r es cero.

En la práctica analítica, las gráficas de calibración proporcionan frecuentemente valores numéricos de r mayores que 0,99.

- **Coefficiente de determinación**

La información obtenida mediante el cálculo de r es limitada y no justifica por sí sola la linealidad, siendo r^2 coeficiente de determinación el que aporta una mayor significación estadística ya que expresa la proporción de la variación total de Y explicada por el modelo.

$$r^2 = \frac{(S_{XY})^2}{(S_{XX})(S_{YY})}$$

El coeficiente de determinación denota la fracción de variación representada por el modelo.

- **Tiempo de retención**

Si el coeficiente de correlación es realmente significativo se calcula el valor de t_R , usando la ecuación:

$$t_R = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

- **Recta de regresión**

Se supone que existe una relación lineal entre la señal analítica (Y) y la concentración (X), se calcula la pendiente (b) y el termino independiente (a).

Termino independiente

$$a = \bar{Y} - b\bar{X} = \frac{\sum Y - b \sum X}{n}$$

Pendiente

$$b = \frac{\sum(X - \bar{X})(Y - \bar{Y})}{\sum(X - \bar{X})^2} = \frac{\sum XY - \frac{\sum X \sum Y}{n}}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}$$

- **Errores en la Pendiente y Ordenada en el Origen de la Recta de Regresión**

Calcular el dato estadístico $S_{Y/X}$, que está dado por:

$$S_{Y/X} = \sqrt{\frac{\sum(Y - \hat{Y})^2}{n-2}}$$

Se comprueba que esta ecuación utiliza los residuos de Y, $Y - \hat{Y}$, donde los valores de \hat{Y} son los puntos sobre la recta de regresión calculada, correspondientes a los valores individuales de X es decir. En un cálculo de regresión lineal el número de grados de libertad es (n-2), esto refleja el hecho obvio de que para representar una línea recta sólo se necesita dos puntos.

Después de obtener un valor de $S_{Y/X}$, podemos calcular S_b y S_a , las desviaciones estándar para la pendiente (b) y la ordenada en el origen (a). Éstas están dadas por:

$$S_b = \frac{S_{Y/X}}{\sqrt{\sum (X - \bar{X})^2}}$$

$$S_a = S_b * \sqrt{\frac{\sum X^2}{n}}$$

Tabla 3. Análisis de varianza. ANOVA

	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (gl)	Varianza (V)	
Regresión	$SC_{REG} = \sum n_i(\hat{Y}_i - \bar{Y})^2$	1	V_{REG}	$F_1 = \frac{V_{REG}}{V_{RES}}$
Falta de ajuste	$SC_{FA} = \sum n_i(\bar{Y}_i - \hat{Y}_i)^2$	$k - 2$	V_{FA}	$F_2 = \frac{V_{FA}}{V_{EXP}}$
Error experimental	$SC_{EXP} = \sum \sum (Y_{ij} - \hat{Y}_i)^2$	$\sum_i n_i - k$	V_{EXP}	
Total	$SC_T = \sum_i \sum_j (Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2$	$\sum_i n_i - 1$		

Donde

i=grupos

j=series

\bar{X} = media de X

\bar{Y} = media de Y

SC_{REG} = suma de cuadrados debido a la regresión

V_{REG} = variancia de la regresión

SC_{RES} = variación residual debida al error experimental dentro de los grupos más la variación debida a la falta de ajustes.

V_{RES} = variancia residual.

SC_{EXP} = cálculo del error experimental (suma de cuadrados debido a las réplicas dentro de las series).

V_{EXP} = variancia del error experimental.

SC_{FA} =cálculo del error de regresión o de falta de ajuste (se debe a las dispersión de resultados entre los valores de la recta de regresión y las medias de cada grupo).

SC_T =suma de cuadrados total

V_T = variancia total entre series

Relación entre suma de cuadrados

$$SC_T = SC_{RES} + SC_{REG}$$

$$SC_{RES} = SC_{EXP} + SC_{FA}$$

- **Normalidad de los residuales**

La normalidad de los residuales se puede comprobar mediante la representación gráfica que algunos programas estadísticos realizan de los mismos o bien aplicando un test de normalidad.

Una vez comprobados estos supuestos, se calcularán los estadísticos F_1 y F_2 tal y como se indicó del ANOVA.

$F_{1exp} > F_{1tablas}$ demuestra la existencia de una pendiente distinta de 0.

$F_{2exp} > F_{2tablas}$ demuestra la linealidad entre los resultados obtenidos.

Los valores tabulados para F se obtienen de las tablas estadísticas de acuerdo a los grados de libertad correspondientes y a un grado de significación α normalmente igual a 0.05.

Tabla 4. Evaluación de metodología según las hipótesis planteadas

EVALUADORES	HIPÓTESIS	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Intercepto	$H_0: a = 0$	$T_{a(\text{exp})} < t_{(\text{tab})}$ no se rechaza la hipótesis nula
Coefficiente de correlación	$H_0: r = 0$	$T_{r(\text{exp})} > t_{(\text{tab})}$ se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto el coeficiente de correlación no es igual a cero
Pendiente	$H_0: b \neq 0$	$T_{b(\text{exp})} > t_{(\text{tab})}$ se acepta la hipótesis nula, donde la pendiente no es igual a cero

- **Intercepto (a):** $H_0: a = 0$
 $H_1: a \neq 0$
- **Coefficiente de correlación (r):** $H_0: r = 0$
 $H_1: r \neq 0$
- **Pendiente (b):** $H_0: b = 0$
 $H_1: b \neq 0$

6.11.3 Precisión intermedia

Se acepta un coeficiente de variación de analistas y global menor al 5%.

Tabla 5. Anova precisión intermedia

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F_0
Entre los tratamientos	$SS_{TRA} = n \sum_{i=1}^a (\bar{Y}_i - \bar{Y})^2$	$a - 1$	MS_{TRA}	$F_0 = \frac{MS_{TRA}}{MS_E}$
Error (dentro de los tratamientos)	$SS_E = SS_T - SS_{TRA}$	$N - a$	MS_E	
Total	$SS_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^n (Y_{ij} - \bar{Y})^2$	$N - 1$		

La hipótesis nula (H_0) sea verdadera no hay una diferencia considerable en el sistema entre los resultados obtenidos debido a los analistas o los días a las diferentes concentraciones; si $F_0 < F_{(\text{tablas})}$ se acepta la hipótesis nula.

La hipótesis alterna (H_1) sea verdadera hay una diferencia considerable en el sistema entre los resultados obtenidos por los diferentes analistas o por los días

realizados los análisis a las diferentes concentraciones; si $F_0 > F_{(tablas)}$ se acepta la hipótesis alterna.

6.11.4 Valores predictivos

Estos se estiman con base en una tabla de 2x2 y se calcula así:

- **Valor predictivo positivo** = $a / (a+b)$
- **Valor predictivo negativo** = $d / (d+c)$, donde

a) Valores verdaderos positivos	b) Valores falsos positivos
c) Valores falsos negativos	d) Valores verdaderos negativos

7 CONDICIONES DE CROMATOGRAFÍA Y DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS

A continuación se describen las condiciones en las cuales se trabajó el cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A acoplado a espectrómetro de masas cuadrupolo Agilent Technologies 5975C.

Se aplicaron las siguientes condiciones:

Columna: HPDB-5-MS (95% Dimetilpolisiloxano- 5% de Fenil), de (30m X 0,25mm X 0,25 μ m) con temperatura máxima de 325 °C.

Gas portador: Helio grado 5,0.

Temperatura de la línea de inyección: 180 °C.

Parámetros de flujo: 19,95 psi y 5,52 mL/minuto de flujo total.

Programa del horno: Temperatura inicial de 70 °C por 2 minutos, aumentando 15 °C/minuto hasta los 200 °C, luego se aumenta 5 °C/minuto hasta alcanzar los 212 °C, manteniéndose durante 3 minutos, después se incrementa 5 °C hasta los 225 °C y por último se aumenta 15 °C/minuto hasta 270 °C.

Modo inyección: Splitless.

Tiempo de corrida: 21,667 minutos.

Post run: 310 °C durante 1 minuto.

Estos parámetros fueron los utilizados para determinar cuál de los volúmenes permitía una mejor extracción para la identificación de los plaguicidas.

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El trabajo fue realizado con 13 diferentes tipos de pesticidas, utilizando en distintos casos una variedad de ellos.

8.1 VOLÚMENES DE EXTRACCIÓN

Para la determinación de los volúmenes de extracción se trabajó con 11 pesticidas, los cuales fueron:

Tabla 6. Volúmenes utilizados para el Carbofurano

CARBOFURANO	
Volumen (mL)	Promedio áreas
2	9.566×10^7
3	3.869×10^8
4	6.519×10^8
5	1.018×10^9
6	1.281×10^9
7	9.203×10^8
8	1.002×10^9
9	1.107×10^9
10	1.130×10^9

Estos datos permitieron construir la siguiente gráfica:

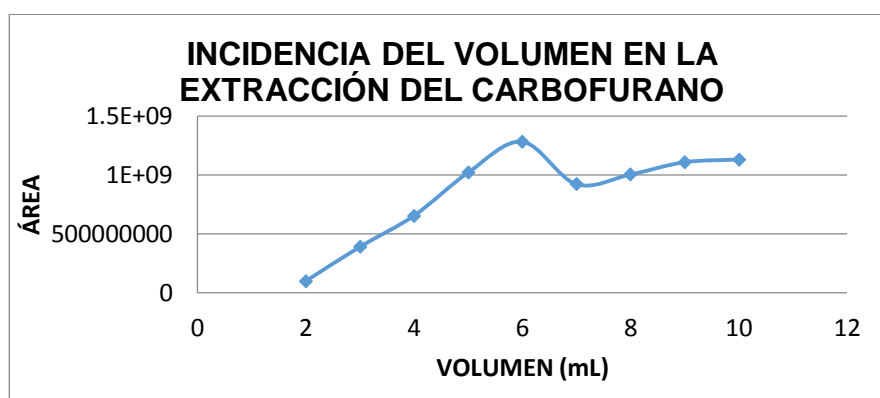


Figura 22. Incidencia del volumen en la extracción del carbofurano

Estos resultados obtenidos indican que el mejor volumen a utilizar para las extracciones es de 6 mL de solución extractora ya que esto también es aplicable

para otros pesticidas (heptacloro, clorpirifós, endosulfán); exceptuando algunos casos como el siguiente:

Tabla 7. Volúmenes utilizados para el Aldrín

ALDRÍN	
Volumen (mL)	Promedio áreas
2	3.595×10^8
3	3.860×10^8
4	5.753×10^8
5	9.697×10^8
6	1.116×10^9
7	8.812×10^8
8	1.204×10^9
9	1.081×10^9
10	9.980×10^8

Estos datos permiten construir la siguiente gráfica:

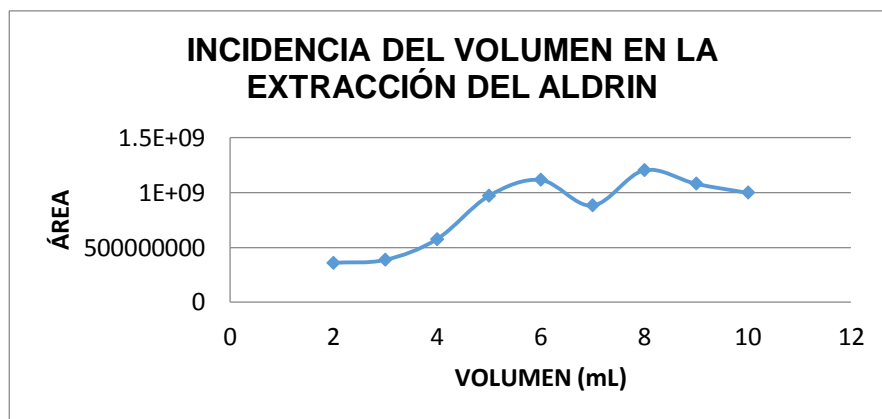


Figura 23. Incidencia del volumen en la extracción del Aldrín

Los anteriores datos muestran que el volumen de extracción a utilizar es de 8 mL de solución extractora al igual que en otros pesticidas (metil paratión, carbaril), pero debido a que la cantidad extraída con 6 mL es similar por cuestiones de costos es aceptable utilizar el volumen anterior.

Sin embargo hubo algunos pesticidas los cuales no tuvieron una buena extracción con los 6 mL de solución extractora o por motivos de coelución con otros compuestos (tetradifón, metomilo, malatión, dimetoato) no se pueden visualizar en el cromatograma pero, debido a sus iones de masa y tiempo de retención característicos se pueden localizar.

8.2 IDONEIDAD

Para determinar la idoneidad y especificidad del sistema cromatográfico se realizó un análisis estadístico sobre 15 réplicas correspondientes al estándar preparado que contiene todos los analitos de interés.

La idoneidad de un sistema cromatográfico consiste en evaluar que los parámetros cromatográficos estén dentro de criterios de aceptación garantizando que el equipo y el método son los adecuados para el análisis al momento de validar (Ver figuras 24 a y 24 b).

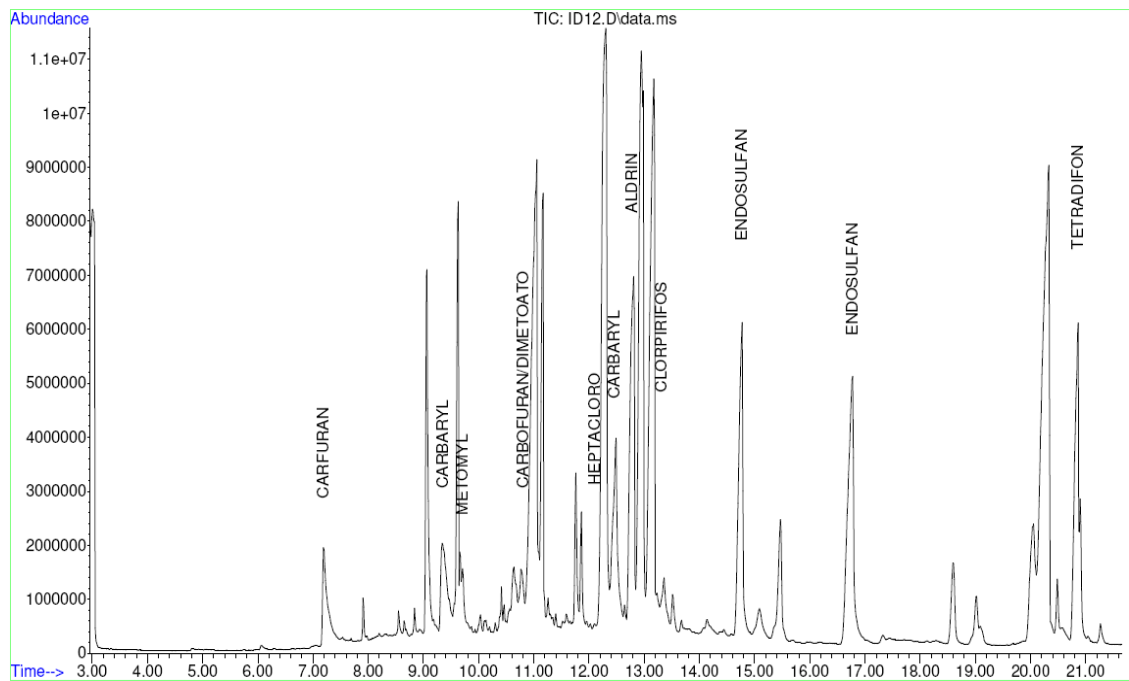


Figura 24 a. Cromatograma que contiene una mezcla de analitos de interés.

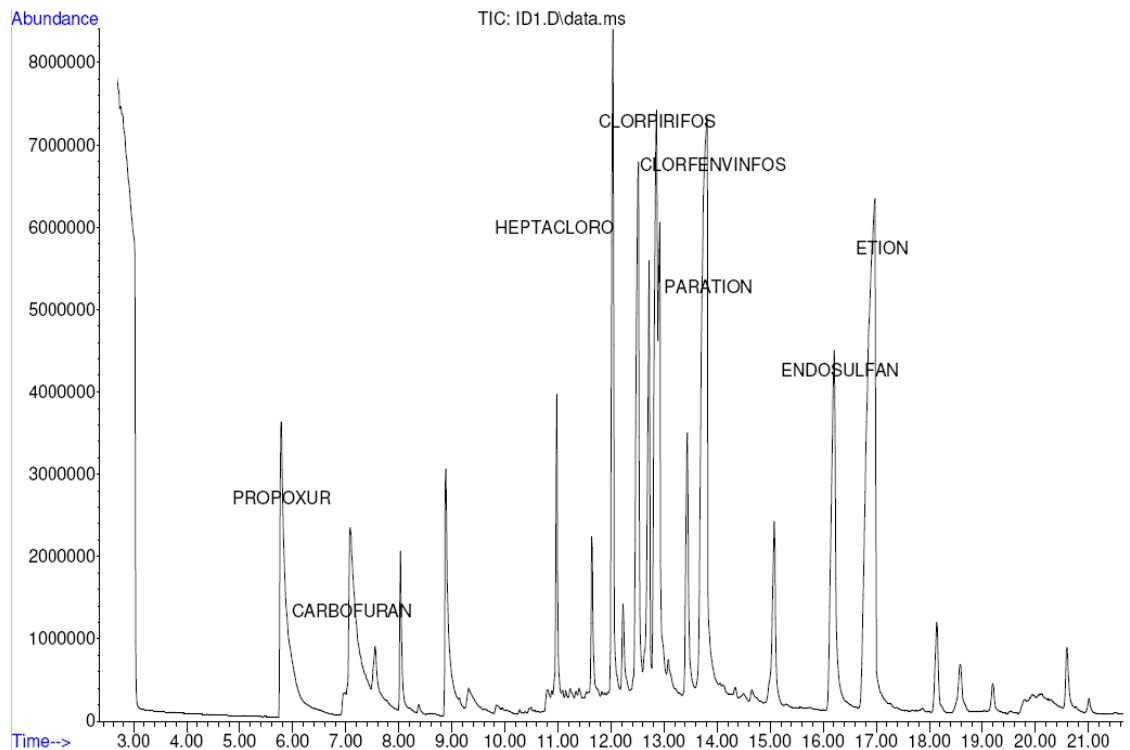


Figura 24 b. Cromatograma que contiene una mezcla de analitos de interés.

Como se puede observar en los cromatogramas los diferentes analitos son separados adecuadamente habiendo solapamiento entre unos pocos de ellos, se observa que la resolución, parámetro fundamental es óptima para este método por lo tanto la columna se encuentra en un buen estado porque separa a cada analito de interés obteniendo un tiempo de retención característico.

8.2.1 Parámetros cromatográficos

Parámetros cromatográficos para propoxur, carbofurano, heptacloro, clorpirifós clorfenvinfos, paratión, endosulfán, etión, metomilo, paratión metil, carbaril, aldrín y tetradifón en sistema y método (Ver tablas 8 y 9).

Tabla 8. Números analíticos de mérito del método cromatográfico de los analito de interés.

COMPUESTO	t _R (min)	CV	N	'k	Rs
METOMILO	9,6619	0,0035	1999190,2317	1,0455	NA
PARATIÓN METIL	12,2485	0,0016	1202468,7893	1,3254	16,5836
CARBARIL	12,4665	0,0041	252408,6658	1,3490	2,3170
ALDRÍN	12,9466	0,0012	402304,4968	1,4009	5,2197
α – ENDOSULFAN	14,7507	0,0017	543523,1784	1,5961	18,7006
TETRADIFON	20,8556	0,0028	927820,7401	2,2567	72,6747
PROPOXUR	5,8957	0,0138	15147,1406	0,6380	NA
CARBOFURANO	7,1538	0,0066	26955,0749	0,7741	6,6754
HEPTACLORO	12,0497	0,0012	648697,6329	1,3039	41,1040
CLORPIRIFÓS	12,8872	0,0013	387060,2665	1,3945	11,5182
PARATIÓN	12,9511	0,0023	829467,2293	1,4014	0,8760
CLORFENVINFOS	13,8575	0,0028	153599,2433	1,4995	8,9700
β – ENDOSULFAN	16,2417	0,0022	424327,4652	1,7575	19,4654
ETIÓN	17,0429	0,0039	169296,8489	1,8441	5,9210

Tabla 9. Criterios de aceptación para los parámetros cromatográficos

Parámetros evaluados	Criterio de aceptación
Tiempo de retención (t _R)	CV ≤ 5%
Numero de platos teóricos (N)	> 2000
Factor de capacidad ('k)	> 2
Resolución (Rs)	≥ 2

Para sistema el cálculo de los parámetros cromatográficos se realizó con el software del equipo, y Excel obteniendo así los resultados que se encuentra en la tabla 8.

Se puede observar que los tiempos de retención para cada analito presenta un coeficiente de variación menor al 5%, por lo tanto es aceptable porque no hay

diferencia significativa en los datos reportados. En cuanto al factor de capacidad la mayoría de los analitos reporta valores mayores de 1 por lo tanto los picos son selectivos, consiguiéndose así una buena resolución.

La cantidad de platos teóricos expresa el número de picos que pueden aparecer en el cromatograma por unidad, determinando la eficiencia de la columna cromatográfica, los analitos presentan valores mayores que 2000 significativamente altos, eso quiere decir que la columna utilizada se encuentra en buen estado. En cuanto a la resolución lo ideal es que se presenten valores mayores que 2 lo que quiere decir que la columna tiene capacidad para separar completamente los pesticidas exceptuando al paratión como se puede observar en la figura 24b, para lo cual se utilizó las fragmentaciones moleculares de los compuestos (Ver tabla 10).

Tabla 10. Fragmentaciones moleculares de los compuestos de interés.

Pesticidas	t_R (min)	Iones característicos (m/z)
Metomilo	9,6619	139, 105, 88, 73, 58, 42
Paratión metil	12,2485	263, 216, 172, 108, 47
Carbaril	12,4665	144, 115, 116, 57, 58, 63, 145, 89
Aldrín	12,9466	66, 91, 79, 263, 65, 101, 261, 265
α – Endosulfan	14,7507	339, 241, 170, 121, 85, 39, 265, 195
Tetradifon	20,8556	159, 111, 227, 75, 356, 127, 175, 50, 99, 145, 85
Propoxur	5,8957	110, 152, 27, 81, 39, 137
Carbofurano	7,1538	164, 149, 122, 58, 39, 15, 91, 221, 107
Heptacloro	12,0497	100, 272, 65, 39, 135, 237, 337, 374, 115
Clorpirifós	12,8872	314, 197, 97, 29, 258, 286, 125, 351
Paratión	12,9511	109, 291, 137, 29, 155, 186, 65, 235, 81, 263, 218
Clorfenvinfos	13,8575	267, 323, 29, 81, 109, 295, 170, 360
β – Endosulfan	16,2417	195, 241, 170, 265, 339, 75, 120
Etión	17,0429	97, 231, 65, 125, 153, 45, 175, 199, 384, 80, 111

8.3 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Para determinar la linealidad de un método, se realiza una curva de calibración o la recta de regresión lineal, donde se relaciona la respuesta instrumental que produce siendo esta la variable dependiente Y que es la relación de áreas y la variable independiente X que son las relaciones de concentraciones, la relación entre estas dos variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo $y=bx+a$.

La linealidad solo se determinó en 5 plaguicidas debido a escasos estándares para su determinación.

Tabla 11. Linealidad del sistema

COMPUESTO	r	r ²	ECUACIÓN DE LA RECTA	LD (mg/L)	LC (mg/L)
Carbofurano	0,9372	0,8783	$y = 7,364x - 5,903$	0,0151	0,1514
Clorpirifós	0,7084	0,5018	$y = 0,709x + 0,106$	1,2231	12,2310
Heptacloro	0,9592	0,9201	$y = 4,632x - 4,177$	0,0241	0,2407
Paratión	0,9494	0,9014	$y = 0,970x - 0,166$	0,9108	9,1081
Propoxur	0,8274	0,6845	$y = 9,967x - 2,142$	0,0985	0,9855

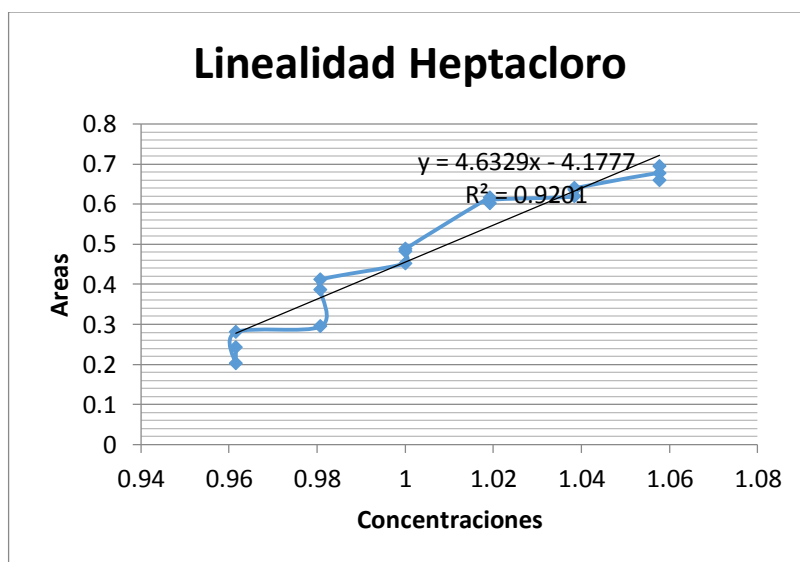


Figura 25. Linealidad del heptacloro

La linealidad del método se comprobó con soluciones entre 100 a 110 ppm para los plaguicidas, a excepción del clorpirifós, paratión y propoxur para los cuales se

utilizaron soluciones entre 100 y 200 ppm. Aunque la metodología de linealidad se trata de 6 niveles de concentración con 3 repeticiones por nivel, las soluciones que son de 100 a 200 ppm solo se les hicieron 5 niveles.

Se observa que los resultados de las curvas para cada plaguicida presenta un coeficiente de correlación (r) muy variado y algo alejado de la unidad, con lo cual se indica una regular relación entre la concentración x de cada plaguicida y su respuesta y , además también muestra a través del coeficiente de determinación (r^2) que el modelo planteado posee una relación aceptable de respuestas entre sus variables, es decir que podremos obtener a concentraciones altas de los plaguicidas una respuesta en su área mayor lo que me permite identificar con mayor facilidad el compuesto de interés en el cromatograma; también se puede observar que los límites de detección del sistema para los plaguicidas son bajos, lo cual se puede identificar estos compuestos a concentraciones bajas en las muestras biológicas de interés forense.

A partir de los valores de linealidad, a continuación se verifica por medio del análisis de t – student la linealidad del método (Tablas 12 – 16).

Tabla 12. Datos obtenidos para el análisis t – student de linealidad del carbofurano

CARBOFURANO		
Parámetro	Valor	Criterio de aceptación
B	7,3641	$t_b > t_{(tab)}$ se acepta la hipótesis nula donde la pendiente no es igual a cero
S_b	1,9644	
t_b	3,7487	
A	-5,9035	$t_a < t_{(tab)}$ se acepta la hipótesis nula, el intercepto no es significativamente diferente de cero
S_a	1,9844	
t_a	-2,9750	
t_r	24,5713	$t_r > t_{(tab)}$ se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto el coeficiente de correlación no es igual a cero
t_{tabla}	2,1200	

Tabla 13. Datos obtenidos para el análisis t – student de linealidad del heptacloro

HEPTACLORO		
Parámetro	Valor	Criterio de aceptación
B	4,6329	$t_b > t_{(tab)}$ se acepta la hipótesis nula donde la pendiente no es igual a cero
S _b	1,2075	
t _b	3,8368	
A	-4,1777	$t_a < t_{(tab)}$ se acepta la hipótesis nula, el intercepto no es significativamente diferente de cero
S _a	1,2197	
t _a	-3,4251	
t _r	40,9142	$t_r > t_{(tab)}$ se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto el coeficiente de correlación no es igual a cero
t _{tabla}	2,1200	

Tabla 14. Datos obtenidos para el análisis t – student de linealidad del clorpirifós

CLORPIRIFÓS		
Parámetro	Valor	Criterio de aceptación
B	0,6582	$t_b > t_{(tab)}$ se acepta la hipótesis nula donde la pendiente no es igual a cero
S _b	0,2577	
t _b	2,5542	
A	0,1499	$t_a < t_{(tab)}$ se acepta la hipótesis nula, el intercepto no es significativamente diferente de cero
S _a	0,2648	
t _a	-0,5660	
t _r	3,6189	$t_r > t_{(tab)}$ se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto el coeficiente de correlación no es igual a cero
t _{tabla}	2,1600	

Tabla 15. Datos obtenidos para el análisis t – student de linealidad del paratión

PARATIÓN		
Parámetro	Valor	Criterio de aceptación
B	0,8840	$t_b > t_{(tab)}$ se acepta la hipótesis nula donde la pendiente no es igual a cero
S _b	0,2582	
t _b	3,4232	
A	-0,0893	$t_a < t_{(tab)}$ se acepta la hipótesis nula, el intercepto no es significativamente diferente de cero
S _a	0,2653	
t _a	0,3367	
t _r	10,9029	$t_r > t_{(tab)}$ se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto el coeficiente de correlación no es igual a cero
t _{tabla}	2,1600	

Tabla 16. Datos obtenidos para el análisis t – student de linealidad del propoxur

PROPOXUR		
Parámetro	Valor	Criterio de aceptación
B	8,1688	$t_b > t_{(tab)}$ se acepta la hipótesis nula donde la pendiente no es igual a cero
S _b	2,7382	
t _b	2,9832	
A	- 0,5091	$t_a < t_{(tab)}$ se acepta la hipótesis nula, el intercepto no es significativamente diferente de cero
S _a	2,8133	
t _a	0,1810	
t _r	5,3120	$t_r > t_{(tab)}$ se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto el coeficiente de correlación no es igual a cero
t _{tabla}	2,1600	

Los resultados obtenidos para el análisis t-student nos muestran que los plaguicidas cumplen con la mayoría de las hipótesis establecidas, comprobando que el sistema posee, un comportamiento lineal.

Por último se verifica la linealidad por medio del análisis de varianza ANOVA (Tablas 20 – 21).

Tabla 17. Anova carbofurano

ANOVA					
Suma cuadrados		gl	Prom. Cuadra	F	F critico
regresión	1,1988	1,0000	1,0529	115,4687	4,4940
residuo	0,1459	16,0000	0,0091		
total	1,1988	17,0000			

Tabla 18. Anova heptacloro

ANOVA					
Suma cuadrados		gl	Prom. Cuadra	F	F critico
regresión	0,4529	1,0000	0,4167	184,1804	4,4513
residuo	0,0362	16,0000	0,0023		
total	0,4529	17,0000			

Tabla 19. Anova clorpirifós

ANOVA					
Suma cuadrados		gl	Prom. cuadra	F	F critico
regresión	0,7195	1,0000	0,3611	13,0962	4,6001
residuos	0,3584	13,0000	0,0276		
total	0,7195	14,0000			

Tabla 20. Anova paratión

ANOVA					
Suma cuadrados		gl	Prom. cuadra	F	F critico
regresión	0,7223	1,0000	0,6511	118,8737	4,6001
residuos	0,0712	13,0000	0,0055		
total	0,7223	14,0000			

Tabla 21. Anova propoxur

ANOVA					
Suma cuadrados		gl	Prom. cuadra	F	F critico
regresión	81,2279	1,0000	55,6083	28,2169	4,6001
residuos	25,6197	13,0000	1,9707		
total	81,2279	14,0000			

Como se muestra en los resultados obtenidos en el análisis de varianza para cada curva de calibración de los plaguicidas el valor de F hallado es mayor que el valor crítico de F lo cual puede confirmar con este análisis de varianza que la pendiente es distinta de cero por lo cual la curva de calibración para cada plaguicida posee un comportamiento lineal.

8.4 PRECISIÓN

La precisión sirve para comprobar que entre los datos no hay dispersión, por lo tanto el método debe generar datos relacionados. Este término está determinado por dos conceptos, la repetibilidad que evalúa que no existan errores sistemáticos y la precisión intermedia, que evalúa el comportamiento del método en varios días y con varios analistas.

8.4.1 Repetibilidad

Este procedimiento se realiza con 5 niveles de concentración diferentes que están constituidos desde 100 hasta 200 ppm de cada uno de los pesticidas realizando 3 repeticiones por nivel, tomando como datos los tiempos de retención (t_R) observados en las tablas 22a y 22b.

Tabla 22a. Datos obtenidos para el análisis de repetibilidad

HEPTACLORO		CARBOFURANO		ENDOSULFÁN		PARATIÓN	
NIVEL	t _R	NIVEL	t _R 1	NIVEL	t _R	NIVEL	t _R
1	12,121	1	7,478	1	16,398	1	12,990
	12,118		7,428		16,372		13,030
	12,111		7,542		16,396		13,042
	12,116		7,484		16,386		12,946
2	12,125	2	7,354	2	16,378	2	13,053
	12,122		7,392		16,370		13,013
	12,121		7,505		16,381		12,931
	12,119		7,422		16,351		12,979
3	12,119	3	7,415	3	16,436	3	12,964
	12,118		7,433		16,458		12,991
	12,116		7,467		16,352		12,957
	12,114		7,418		16,347		13,065
4	12,111	4	7,423	4	16,388	4	12,941
	12,111		7,427		16,374		13,003
	12,111		7,426		16,380		12,967
	12,126		7,422		16,396		12,954
5	12,126	5	7,425	5	16,385	5	12,967
	12,124		7,416		16,451		12,939
	12,123		7,426		16,386		12,965
	12,122		7,483		16,399		12,967
Prom.	12,119		7,439		16,389		12,983
SD	0,005		0,042		0,030		0,039
CV	0,000		0,006		0,002		0,003

Tabla 22b. Datos obtenidos para el análisis de repetibilidad

PROPOXUR		CLORPIRIFÓS		DIMETOATO		ETIÓN	
NIVEL	tR 1	NIVEL	tR	NIVEL	tR	NIVEL	tR
1	6,067	1	12,763	1	10,880	1	16,931
	6,078		12,748		10,831		16,970
	6,092		12,824		10,930		16,915
	6,094		12,800		10,978		17,092
2	6,080	2	12,713	2	10,991	2	16,943
	6,049		12,740		10,803		16,938
	6,057		12,720		10,865		16,991
	6,042		12,676		10,983		16,956
3	6,078	3	12,735	3	10,966	3	16,918
	6,057		12,670		10,961		16,933
	6,107		12,702		10,852		16,954
	6,078		12,712		10,930		16,883
4	6,061	4	12,774	4	10,843	4	16,984
	6,051		12,697		10,981		17,005
	6,080		12,725		11,005		16,967
	6,042		12,728		10,933		16,945
5	6,055	5	12,725	5	10,885	5	16,950
	6,078		12,725		10,983		16,983
	6,086		12,728		10,821		17,005
	6,065		12,807		10,893		16,998
Prom.	6,070		12,736		10,916		16,963
SD	0,018		0,041		0,065		0,044
CV	0,003		0,003		0,006		0,003

Los coeficientes de variación entre los tiempos de retención cumplen con el criterio de aceptación, los cuales son menores al 2%. Esto demuestra que el método para el análisis de estas sustancias proporciona resultados constantes lo que indica una buena repetibilidad.

8.4.2 Precisión intermedia

La precisión intermedia como se menciona en la metodología fue desarrollada por dos analistas para dos niveles de concentración los cuales se encontraban en el rango de las curvas con 3 repeticiones por nivel para cada pesticida, los resultados son los tiempos de retención de cada uno de los pesticidas estos se observan a continuación con su análisis de varianza correspondiente.

Tabla 23. Datos obtenidos para el análisis de precisión intermedia para el propoxur

	DÍA 1				DÍA 2				DÍA 3			
	CONC. 1		CONC. 2		CONC. 1		CONC. 2		CONC. 1		CONC. 2	
	Anal.1	Anal. 2	Anal.1	Anal. 2	Anal.1	Anal. 2	Anal.1	Anal. 2	Anal.1	Anal. 2	Anal.1	Anal. 2
PROPOXUR	9,6370	9,6800	9,7480	9,5620	9,7200	9,6200	9,5940	9,6670	9,6300	9,6470	9,4840	9,5470
	9,8490	9,7190	9,7360	9,5250	9,6670	9,5620	9,6730	9,5260	9,6140	9,4790	9,5620	9,5360
	9,6740	9,6460	9,7380	9,5740	9,6790	9,6360	9,6470	9,5570	9,6200	9,6600	9,5320	9,5700
Prom.	9,7200	9,6817	9,7407	9,5537	9,6887	9,6060	9,6380	9,5833	9,6213	9,5953	9,5260	9,5510
DS	0,1132	0,0365	0,0064	0,0255	0,0278	0,0389	0,0403	0,0741	0,0081	0,1010	0,0393	0,0173
CV	0,0117	0,0038	0,0007	0,0027	0,0029	0,0041	0,0042	0,0077	0,0008	0,0105	0,0041	0,0018

Tabla 24. Anova de precisión intermedia del propoxur en el sistema

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F ₀	F _c
ENTRE LOS TRATAMIENTOS	0,0036015	1	0,0036015	1,49792	7,708
DENTRO DE LOS TRATAMIENTOS	0,009617333	4	0,002404333		
TOTAL	0,013218833	5			
FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F ₀	F _c
ENTRE LOS TRATAMIENTOS	0,007826482	1	0,007826482	1,32066	7,708
DENTRO DE LOS TRATAMIENTOS	0,023704707	4	0,005926177		
TOTAL	0,031531188	5			

En el análisis de varianza (ANOVA) para cada plaguicida, se realiza la comparación para cada concentración entre los resultados obtenidos por cada analista durante días diferentes arrojando como resultado que no existe diferencia significativa en el sistema entre los resultados obtenidos debido a los analistas o a los días para cada nivel de concentración, es decir, se aprueba la hipótesis nula dado que la prueba de F muestra que el F₀ es menor que el F_c encontrado en la literatura, por lo tanto el sistema para cada pesticida no presenta variabilidad ni entre los analistas ni entre los días, esto también se puede observar con el coeficiente de varianza (CV%) para cada analista y el global que no arrojan resultados mayores al 5%.

8.5 VALORES PREDICTIVOS

Fueron tomadas 80 muestras conocidas, las cuales, de las cuales cuarenta habían sido enriquecidas con mezclas de plaguicidas y cuarenta se conocía la ausencia de estos. La selectividad y la presencia de falsos positivos y negativos en la metodología analítica.

Tabla 25. Resultados valores predictivos

a = 40	b = 0
c = 0	d = 40

Según la fórmula tenemos que $V_p (+) = 100\%$, que es la probabilidad de que una muestra leída como positiva, verdaderamente lo sea.

$V_p (-) = 100\%$, que es la probabilidad de que una muestra reportada como negativa lo sea.

Especificidad según la fórmula es: $E = 100\%$, que representa la probabilidad de encontrar una negativa una muestra que no contenga realmente el analito buscado.

8.6 ESTABILIDAD

La estabilidad para los pesticidas se ha desarrollado por tres días consecutivos, para una mezcla de los pesticidas que contiene propoxur, heptacloro, clorpirifós y endosulfán, los cuales se separan en dos categorías, refrigerados y a temperatura ambiente; también se le hace un estudio a una mezcla de pesticidas refrigerados que contiene diclorvos, carbofurano, clorpirifós y endosulfán.

Tabla 26. Resultados de estabilidad

	ESTABILIDAD D1		ESTABILIDAD D2		ESTABILIDAD D5	
	AMBIENTE	FRIO	AMBIENTE	FRIO	AMBIENTE	FRIO
	PROPOXUR		PROPOXUR		PROPOXUR	
	9,637	9,721	9,541	9,585	9,532	9,523
	9,662	9,707	9,601	9,553	9,594	9,561
	9,583	9,6	9,6	9,626	9,529	9,537
Prom.	9,6273333	9,676	9,5806667	9,588	9,5516667	9,5403
SD	0,0403774	0,0662	0,034356	0,0366	0,0366924	0,0192
CV	0,004194	0,0068	0,003586	0,0038	0,0038415	0,002
	HEPTACLORO		HEPTACLORO		HEPTACLORO	
	11,703	11,75	11,604	11,636	11,545	11,546
	11,717	11,738	11,642	11,624	11,546	11,549
	11,624	11,677	11,642	11,652	11,55	11,548
Prom.	11,681333	11,722	11,629333	11,637	11,547	11,548
SD	0,0501431	0,0391	0,0219393	0,014	0,0026458	0,0015
CV	0,0042926	0,0033	0,0018865	0,0012	0,0002291	0,0001
	CLORPIRIFÓS		CLORPIRIFÓS		CLORPIRIFÓS	
	12,496	12,57	12,411	12,444	12,353	12,355
	12,524	12,547	12,456	12,43	12,358	12,355
	12,466	12,462	12,453	12,473	12,355	12,343
Prom.	12,495333	12,526	12,44	12,449	12,355333	12,351
SD	0,0290057	0,0569	0,0251595	0,0219	0,0025166	0,0069
CV	0,0023213	0,0045	0,0020225	0,0018	0,0002037	0,0006
	ENDOSULFÁN		ENDOSULFÁN		ENDOSULFÁN	
	15,403	15,612	15,264	15,407	15,318	15,134
	15,424	15,591	15,257	15,378	15,27	15,243
	15,658	15,437	15,255	15,455	15,135	15,229
Prom.	15,495	15,547	15,258667	15,413	15,241	15,202
SD	0,1415521	0,0956	0,0047258	0,0389	0,0948841	0,0593
CV	0,0091353	0,0061	0,0003097	0,0025	0,0062256	0,0039

Tabla 27. Resultados de estabilidad con plaguicidas guardados desde el 2011

MEZCLA 2011				
	DICLORVOS	CARBOFURANO	CLORPIRIFÓS	ENDOSULFÁN
	6,48	10,57	12,417	15,441
	6,464	10,57	12,418	15,436
	6,459	10,567	12,418	15,427
Prom.	6,467666667	10,569	12,417666667	15,434666667
SD	0,010969655	0,001732051	0,00057735	0,007094599
CV	0,001696076	0,00016388	4,64943E-05	0,000459654

Los resultados obtenidos para estabilidad (refrigeración 4 °C y temperatura ambiente) muestran que son estables en el tiempo ya que el coeficiente de variación para cada medida es inferior al 5% para cada medición, es decir, no hay diferencia significativa entre medidas para cada día.

Los parámetros de idoneidad, linealidad, precisión, precisión intermedia, estabilidad y valor predictivo calculados para verificar la validez del método de extracción, indican que este es acorde para realizar análisis cualitativos de plaguicidas en sangre post mortem, lo cual se confirmara con el estudio de casos reales.

9 ESTUDIO DE CASOS

Finalmente después de obtener la estandarización del método este se puso en práctica en el estudio de casos reales dando como resultado lo siguiente:

- **CASO 1:**

Hombre adulto de 45 años el cual fallece luego de presentar problemas respiratorios, desprendimiento de salivación excesiva, rigidez maxilar y flacidez corporal, se le hacen pruebas toxicológicas, entre ellas la presencia de plaguicidas en contenido gástrico, arroja una identificación positiva de endosulfán, el cual es un plaguicida organoclorado.

- **CASO 2:**

Hombre adulto de 73 años quien ingiere sustancia desconocida, luego de haber consumido grandes cantidades de alcohol fallece al ingresar a urgencias, se realizan tanto pruebas alcoholimétricas como toxicológicas hallando una gran cantidad de etanol en su sistema así como de carbofurano, el cual es un plaguicida perteneciente al grupo de los carbamatos.

- **CASO 3:**

Hombre joven de 33 años con extraño comportamiento similar a ebriedad fallece dentro de las instalaciones de urgencia del hospital, luego de realizársele exámenes toxicológicos se le encuentra en el sistema presencia de dos plaguicidas, los cuales fueron el clorpirifós y el paratión los cuales son pertenecientes a los plaguicidas organofosforados.

Gracias al estudio de estos casos se verifica la utilidad del método estandarizado y su funcionamiento.

10 CONCLUSIONES

- Se logró estandarizar y validar una metodología de extracción y de identificación de pesticidas en fluidos de interés forense empleando Cromatografía de Gases Acoplado a espectrometría de Masas (GC-MS), dicha metodología es utilizada para cualificar los pesticidas en muestras de sangre.
- Los parámetros de idoneidad del sistema cromatográfico muestran que la metodología desarrollada es adecuada y que el equipo se encuentra en condiciones adecuadas para la cualificación de los plaguicidas.
- Para la extracción de plaguicidas en sangre post mortem se debe utilizar 6 mL de solución extractora (60 hexano: 20 acetona: 20 diclorometano), ya que esta cantidad asegura una extracción del analito requerido y este puede ser identificado por medio de su tiempo de retención y/o sus iones de masas característicos (m/z).
- Para evaluar los volúmenes de extracción de plaguicidas en sangre se ensayaron volúmenes que van desde 2 mL hasta 10 mL, encontrando un aumento en la cantidad extraída de plaguicida de 2 a 6 mL y cuyo valor comienza a disminuir a partir de este volumen, por lo tanto el volumen de extracción óptimo es de 6 mL.
- En el campo forense, es primordial que tanto una muestra positiva no sea considerada negativa como el caso contrario, por tanto, es importante que un método analítico este en la capacidad de evitar este tipo de errores, lo cual se logra en virtud a la obtención de adecuados valores predictivos.
- Al realizar el estudio de casos reales se pudo identificar satisfactoriamente en los 3 casos analizados la presencia de plaguicidas.
- Se sugiere igualmente considerar la posibilidad de validar las diferentes técnicas en otras matrices de gran importancia como es el caso del contenido gástrico.
- Con base en los resultados obtenidos se propone que en estudios posteriores se considere la posibilidad de incluir alguna técnica cuyo fundamento incluya la determinación del analito utilizando métodos instrumentales a fin de contar con un método de confirmación aún más sensible y confiable y de implementar un método como la micro extracción en fase sólida.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] ANCAN R, HILAL A, DAGLIOGLU N, CEKIN N, GULMEN M. Determination of Pesticides in Postmortem Blood and Bone Marrow of Pesticide Treated Rabbits. *Forensic Science International*. 2009.
- [2] USMA J, VILLEGAS C, ARRUBLA J. Evaluación del Grado de Contaminación por Pesticidas Organoclorados del Río Otún, Mediante Gc-Ms. *Scientia et Technica*. 2008.
- [3] RAMÍREZ J. A., LACASAÑA M. Plaguicidas: Clasificación, Uso, Toxicología y Medición de la Exposición. Instituto Nacional de Salud Pública. Dirección de Ciencias Ambientales. Cuernavaca. Morelos.México. 2001.
- [4] TARBAH F, MAHLER H, TEMNE O, DALDRUP T. An Analytical Method for the Rapid Screening of Organophosphate Pesticides in Human Biological Samples and Foodstuffs. *Forensic Science International*. 2001.
- [5] NTC – ISO/IEC 17025, Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y Calibración.
- [6] PÉREZ G, Monografía para Optar al Título de Especialista en Toxicología Forense 2004.
- [7] Institución Nacional de Salud. Vigilancia y Control en Salud Pública. Protocolo de Vigilancia y Control de Intoxicaciones por Plaguicidas. Colombia. 2011.
- [8] ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY. “Pesticides”. Internet: (www.epa.gov/pesticides/about/index.htm <<http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm>>).
- [9] MILLER GT, *Sustaining the Earth*, 6th edition. Thompson Learning, Inc. Pacific Grove, California (2004).
- [10] LARA, G., “Plaguicidas en la biodiversidad del suelo: Su comportamiento como contaminante”. Internet: (www.biociencias.org/odisea/plaguicidas <<http://www.biociencias.org/odisea/plaguicidas>>).
- [11] NTP 512: Plaguicidas Organofosforados: Aspectos Generales y Toxicocinética. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Ministerio del Trabajo y Asuntos Sociales. España.
- [12] “Productos fitosanitarios y nutricionales”. Internet: (www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/index.php?proceso=registro&numero=5682&id_marca=300&base=2012 <http://www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/index.php?proceso=registro&numero=5682&id_marca=300&base=2012>).

alia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/index.php?proceso=registro&numero=5682&id_marca=300&base=2012>).

[13] MOFFAT A, OSSELTON D, WIDDOP B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. Pharmaceutical Press. London. 2011.

[14] Internet: (www.atsdr.cdc.gov/es/<<http://www.atsdr.cdc.gov/es/>>).

[15] Internet: (www.cheminova.es/sites/default/files/documentos/pdf/mt%20Danadim%20progress.pdf<<http://www.cheminova.es/sites/default/files/documentos/pdf/mt%20Danadim%20progress.pdf>>).

[16] "Peligrosidad de agente (Dimetoato)". Internet: (es.scribd.com/doc/47738386/PELIGROSIDAD-DE-AGENTE-DIMETOATO<<http://es.scribd.com/doc/47738386/PELIGROSIDAD-DE-AGENTE-DIMETOATO>>).

[17] "Datos de identificación (Etión)". Internet: (www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/etion.pdf<<http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/etion.pdf>>).

[18] ROBERT L. Metcalf Insect Control in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry" Wiley-VCH, Wienheim, 2002.

[19] PESTICIDE ACTION NETWORK NORTH AMERICA, "Caso sobresaliente. Los pesticidas organoclorados". Internet: (www.chemicalbodyburden.org/cs_organochl.htm<http://www.chemicalbodyburden.org/cs_organochl.htm>).

[20] COTOS, O., PALOMINO, W., "Niveles de colinesterasa serica en agricultores de la localidad de Carapongo (Peru) y determinación de acetilcolinesterasa en frutas y hortalizas cultivadas". Internet: (sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/salud/milla_c_o/generalidades.htm<http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/salud/milla_c_o/generalidades.htm>).

[21] BARTOSCHEK S.; VORHOLT J. A.; THAUER R. K.; GEIERSTANGER B. H., GRIESINGER C., N-Carboxymethanofuran (carbamate) formation from methanofuran and CO₂ in methanogenic archaea: Thermodynamics and kinetics of the spontaneous reaction, Eur. J. Biochem., 2001.

[22] Internet: (www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/carbaryl_ired.pdf<http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/carbaryl_ired.pdf>).

[23] "Hoja de seguridad del carbaril". Internet: (www.apiscis.com/hoja/hojaseguridadcarbaril48sl.pdf<<http://www.apiscis.com/hoja/hojaseguridadcarbaril48sl.pdf>>).

- [24] “EPA bans carbofurano pesticide residues on food”. Internet: (www.ens-newswire.com/ens/may2009/2009-05-11-093.asp <http://www.ens-newswire.com/ens/may2009/2009-05-11-093.asp>).
- [25] “Particularidades del carbofurano”. Internet: (www.ftm.una.ac.cr/plaguicidasdecentroamerica/index.php/base-de-datos/ingredientes-activos/101-carbofuran <http://www.ftm.una.ac.cr/plaguicidasdecentroamerica/index.php/base-de-datos/ingredientes-activos/101-carbofuran>).
- [26] “Datos de identificación (Metomilo)”. Internet: (www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/metomilo.pdf<http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/metomilo.pdf>).
- [27] Internet: (www.bam.com.co/admin_internas/hojas/DOW/M/METOMIL%2090%20WP.pdf <http://www.bam.com.co/admin_internas/hojas/DOW/M/METOMIL%2090%20WP.pdf>).
- [28] WORLD HEALTH ORGANIZATION, “Specifications and evaluations for public health pesticides”. Internet: (www.who.int/whopes/quality/en/propoxur_eval_spec_WHO_October_2005.pdf <http://www.who.int/whopes/quality/en/propoxur_eval_spec_WHO_October_2005.pdf>).
- [29] “Pesticides information profile: Propoxur”. Internet: (pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/metiram-propoxur/propoxur-ext.html <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/metiram-propoxur/propoxur-ext.html>)
- [30] HERNÁNDEZ-GUIJO J. M., Introducción a la Toxicología, Universidad Autónoma de Madrid. España. 2010.
- [31] MINISTERIO DE PROTECCIÓN SOCIAL Guías para el manejo urgencias toxicológicas. Grupo de Atención de Emergencias y Desastres [Informe]. - Bogotá, D.C., Colombia, 2008.
- [32] VARONA Marcela, et al Determinación de los efectos en la salud y Medio ambiente por el uso de plaguicidas en el cultivo de tomate en zonas productivas de Colombia en el marco de un sistema productivo sostenible [Informe]. - Armenia, Quindío, 2011.
- [33] GARCÍA María Desarrollo de nuevas metodologías analíticas basadas en la espectrometría de masas en tándem para la determinación de residuos de plaguicidas en productos de origen animal y compartimentos medioambientales relacionados [Informe]: Tesis doctoral / Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de Química; Universidad de Santiago de Compostella. - Santiago de Compostela, 2010.

- [34] ÁLVAREZ A., Toxicología Forense. 2011.
- [35] “Vigilancia epidemiológica y control sanitario de plaguicidas”. Internet: (www.encolombia.com/medioambiente/hume-decreto077590-c.htm <<http://www.encolombia.com/medioambiente/hume-decreto077590-c.htm>>).
- [36] ARIAS H. Estandarización de una Metodología para la Determinación de Multiresiduo de Plaguicidas en Café Verde [Informe]: Tesis pregrado / Escuela de Química. Facultad de Tecnología; Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia. 2013.
- [37] PAYA A., Fundamento y Funciones de la Espectrometría de Masas, Universidad de Valencia, España. 2006.
- [38] LUDWIG HUBER. Validation of Analytical Methods.
- [39] VALLEJO E., Validación de la Técnica de “Cuantificación de Alcoholemia y Metanol en Muestras de Sangre y Humor Vítreo” por Cromatografía de Gases Acoplado a Detector FID con Automuestreador de Volátiles. Universidad del Quindío. 2012.