



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Determinación de los plaguicidas Aldicarb, Carbofurano y Metamidofos en sangre provenientes de casos forenses mediante Cromatografía Líquida con Espectrometría de Masas Tándem LC-ESI-MS/MS en Cundinamarca, Boyacá y Bogotá**

**Diana Jazmín Mariño Gaviria**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología  
Bogotá D.C., Colombia

2013

# **Determinación de los plaguicidas Aldicarb, Carbofurano y Metamidofos en sangre provenientes de casos forenses mediante Cromatografía Líquida con Espectrometría de Masas Tándem LC-ESI-MS/MS en Cundinamarca, Boyacá y Bogotá**

**Diana Jazmín Mariño Gaviria**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Toxicología**

Directora:

MSc. Nancy Patiño Reyes

Toxicología Forense y Toxicología analítica

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología  
Bogotá D.C., Colombia

2013

*A mi esposo Luis Gabriel por estar a mi lado.*

## Agradecimientos

A la docente Nancy Patiño de la Universidad Nacional, por la dirección y constante asesoría en el desarrollo de esta tesis.

Al Departamento de Toxicología de la Facultad de Medicina, en dirección de la Dra. Alba Rodríguez y al coordinador del programa el Dr. Jairo Téllez por apoyar y promover el desarrollo del presente estudio.

A la Dirección de Investigación Sede Bogotá (DIB) junto con la Facultad de Medicina, quienes mediante la “Convocatoria para el estímulo a la Investigación a través de proyectos y trabajos de investigación en los posgrados de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia- Apoyo a la Investigación en salud 2012” avalaron el soporte financiero.

Al Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses que por medio de su Escuela aceptaron la residencia en el Grupo de Toxicología.

Al Grupo de Toxicología en manos de sus coordinadores Tirso Rodríguez y Patricia Heredia que permitieron realizar el presente trabajo en el laboratorio.

A los peritos forenses del grupo de toxicología: Consuelo Mora por su valiosa orientación, Andrea Bernal y Georgina González por compartir su experiencia en el campo de los plaguicidas, Diego Forero y Jorge Rodríguez por su apoyo logístico.

Al Laboratorio Nacional de Insumos Agrícolas – LANIA en nombre del Msc. Edwin Sámir Barbosa por su colaboración y asesoría en el análisis con plaguicidas.

Al Departamento de Estadística con su servicio de consultoría, especialmente a las estadísticas Maria Alejandra Sánchez Castiblanco y Angela Camila Torres Rubiano quienes asesoraron el tratamiento de datos de esta investigación.

A mis amigos Jairo Peláez, Tatiana Cortés, Johanna David y León Pérez por motivarme a culminar esta meta.

A Angela Torres por su colaboración con la obtención de información.

Finalmente a las personas más importantes de mi vida, mis padres Joaquín y Jazmín porque mi formación es gracias a su perseverancia, mis hermanos Damaris, Jeidy y Wbeimar por depositar su confianza en mí y Luis Gabriel por su amor.

A todas las personas que, de una u otra manera, hicieron posible este estudio.

## Resumen

La presencia y uso de plaguicidas carbamatos y organofosforados dentro de las labores agrícolas y urbanas en Colombia ha sido justificada para el control de plagas, sin embargo; estas sustancias representan una problemática nacional por su carácter tóxico que se asocian con intoxicaciones accidentales o han sido utilizadas con propósitos homicidas o suicidas que resultan en intoxicaciones agudas fatales. El propósito del presente estudio fue desarrollar y validar una metodología analítica para la determinación de los plaguicidas aldicarb, carbofurano y metamidofos en sangre utilizando cromatografía líquida con espectrometría de masas tándem LC-MS/MS. Esta metodología resultó selectiva, precisa, exacta, lineal en el rango de concentraciones de 0,10 a 5,0 µg/mL, con un límite de detección de 0,020 µg/mL para el aldicarb y el carbofuran y de 0,050 µg/mL para el metamidofos, porcentajes de recuperación entre 90 y 102% y estabilidad a temperatura ambiente y en el automuestreador para los tres plaguicidas entre el 80 y el 120%.

La metodología analítica fue aplicada a 34 casos forenses provenientes de los departamentos de Boyacá y Cundinamarca y de la ciudad de Bogotá durante el último trimestre del 2012. De las muestras del presente estudio un 53% eran provenientes de Cundinamarca, seguido por Boyacá con un 29% y Bogotá con el 18%. El carbofuran fue el carbamato más encontrado con un 56% de los casos, seguido por el metamidofos 23% y el aldicarb 21%. El departamento de Boyacá no presentó intoxicación por aldicarb. El carbofuran fue encontrado en un amplio rango de concentración desde 0,020 µg/mL hasta mayor a 5,0 µg/mL, el aldicarb se encontró desde 0,10 hasta 2,5 µg/mL y el metamidofos a una concentración mayor de 5,0 µg/mL. Dentro de los casos estudiados, el género masculino presentó mayor número de intoxicaciones letales (65%) con respecto al femenino (35%) asociada a los plaguicidas en estudio. De la misma muestra el 62% de los occisos fue catalogado como manera de muerte el suicidio, el 23% violenta sin determinar, el 9% homicidio y el 6% en estudio.

Los hallazgos de necropsia del intoxicado por plaguicidas son inespecíficos, por tanto el análisis toxicológico de aldicarb, carbofuran y metamidofos en sangre proporciona información significativa a la conclusión de la causa de muerte y el método analítico validado soporta de manera científica a la resolución de una problemática judicial, de suma importancia en el campo de la toxicología forense.

**Palabras clave:** Aldicarb, Carbofurano, Metamidofos, Cromatografía Líquida con Espectrometría de Masas tándem, LC-MS/MS, toxicología forense.

## Abstract

The presence and use of carbamate and organophosphorous pesticides in agricultural and urban activities in Colombia has been justified for pest control, nevertheless these substances represent a nationwide problem because of their toxic characteristics which have been associated with acute accidental, criminal or suicidal intoxications. The aim of this study was to develop and validate an analytical methodology for the determination of the pesticides aldicarb, carbofuran and methamidophos in blood using liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). This methodology turned out to be selective, precise, accurate and lineal in the concentration range from 0,10 to 5,0 µg/mL. The detection limits were 0,020 µg/mL for aldicarb and carbofuran and 0,050 µg/mL for methamidophos. The recovery percentages were between 90 and 102% and the stability to room temperature and in the autosampler for the three pesticides were between 80 and 120%.

The analytical methodology was applied to 34 forensic cases from the Boyacá and Cundinamarca provinces as well as from Bogotá during the last trimester of 2012. 53% of the samples came from Cundinamarca, 29% from Boyacá and 18% from Bogotá. Carbofuran was the most common carbamate, it was found in 56% of the cases followed by methamidophos (23%) and aldicarb (21%). Boyacá did not showed deaths by aldicarb. Carbofuran was found in a wide concentration range from 0,020 µg/mL to more than 5,0 ng/mL, aldicarb between 0,10 ng/mL and 2,5 µg/mL while methamidophos was found at concentrations greater than 5,0 µg/mL. By gender more fatal intoxications were registered among men with a total of 65% against a 35% among women. 62% of the deaths were suicidal while 23% were violent with undetermined cause, 9% were homicides and 6% remained under study.

The findings at the autopsy of pesticides victims are unspecific. That's why the toxicological determination of aldicarb, carbofuran and methamidophos in blood provided significant information to the determination of the cause of deaths. The validated

analytical method helps in a scientific way with the solution of a judicial problem which is of the utmost importance in the field of forensic toxicology.

**Key words:** Aldicarb, Carbofuran, Methamidophos, Liquid chromatography with tandem mass spectrometry, forensic toxicology

# Contenido

|  | Pág.  |
|--|-------|
| <b>Resumen</b> .....   | V     |
| <b>Lista de figuras</b> .....  | XII   |
| <b>Lista de tablas</b> .....   | XV    |
| <b>Lista de símbolos y abreviaturas</b> .....  | XVIII |
| <b>Introducción</b> .....  | 1     |
| <b>1. Objetivos</b> .....  | 6     |
| 1.1 Objetivo general .....   | 6     |
| 1.2 Objetivos específicos .....  | 6     |
| <b>2. Marco Conceptual</b> .....   | 7     |
| 2.1 Plaguicidas .....  | 7     |
| 2.1.1 Intoxicación aguda por plaguicidas .....                                       | 9     |
| 2.2 Plaguicidas organofosforados .....   | 13    |
| 2.2.1 Toxicocinética de organofosforados .....                                       | 13    |
| 2.2.2 Metamidofos .....  | 17    |
| 2.3 Plaguicidas carbamatos .....   | 20    |
| 2.3.1 Toxicocinética de carbamatos .....   | 20    |
| 2.3.2 Aldicarb .....   | 22    |
| 2.3.3 Carbofurano .....  | 26    |
| 2.4 Toxicodinamia de plaguicidas organofosforados y carbamatos .....                 | 31    |
| 2.4.1 Sinapsis colinérgica .....   | 31    |
| 2.4.2 Mecanismo de acción .....  | 34    |
| 2.4.3 Reactivación por oximas de las colinesterasas inhibidas .....                  | 37    |
| 2.5 Efectos adversos a la salud de los plaguicidas organofosforados y carbamatos ... | 38    |
| 2.5.1 Síndrome intermedio (IMS) .....  | 41    |
| 2.5.2 Neurotoxicidad retardada .....   | 41    |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.5.3 Tratamiento de la intoxicación aguda por plaguicidas organofosforados y carbamatos .....    | 42        |
| 2.6 Toxicología forense.....  | 43        |
| 2.6.1 Hallazgos post-mortem de intoxicación fatal con organofosforados y carbamatos .....         | 45        |
| 2.6.2 Muestras en el análisis toxicológico forense .....  | 46        |
| 2.7 Carbamatos y organofosforados de interés en toxicología forense .....                         | 48        |
| 2.8 Cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem LC-MS/MS.....                     | 51        |
| 2.8.1 Cromatografía líquida (LC).....   | 52        |
| 2.8.2 Cromatografía líquida en fase reversa (RPLC) .....  | 53        |
| 2.8.3 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS).....                       | 54        |
| 2.8.4 Espectrometría de masas en tándem (MS/MS) .....   | 67        |
| 2.8.5 Cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem LC-MS/MS para plaguicidas ..... | 72        |
| 2.9 Validación del método bioanalítico .....  | 73        |
| 2.9.1 Parámetros de validación.....   | 75        |
| <b>3. Metodología</b> .....   | <b>87</b> |
| 3.1 Área geográfica y población de estudio .....  | 87        |
| 3.2 Recolección de datos.....   | 87        |
| 3.3 Criterios de inclusión.....   | 87        |
| 3.4 Unidad de análisis.....   | 88        |
| 3.5 Metodología analítica.....  | 88        |
| 3.5.1 Equipos, materiales y reactivos .....   | 88        |
| 3.5.2 Optimización del sistema instrumental .....   | 92        |
| 3.5.3 Condiciones cromatográficas.....  | 93        |
| 3.5.4 Espectrometría de masas en tándem (MS/MS) .....   | 94        |
| 3.5.5 Validación del método bioanalítico .....  | 94        |
| 3.6 Análisis de datos .....   | 104       |
| 3.7 Consideraciones éticas del estudio .....  | 104       |
| 3.7.1 Consideraciones éticas de la muestra.....   | 105       |

---

|   |     |
|---|-----|
| <b>4. Resultados y Discusión</b> .....  | 106 |
| 4.1 Optimización del sistema instrumental .....   | 106 |
| 4.2 Espectrometría de masas en tándem (MS/MS) .....   | 107 |
| 4.3 Tratamiento de la muestra .....   | 113 |
| 4.4 Validación de la metodología analítica .....  | 115 |
| 4.4.1 Selectividad .....  | 115 |
| 4.4.2 Linealidad y rango .....  | 121 |
| 4.4.3 Límites de detección LOD, inferior de cuantificación LLOQ y superior de cuantificación (ULOQ) ..... | 128 |
| 4.4.4 Precisión .....   | 129 |
| 4.4.5 Exactitud .....   | 136 |
| 4.4.6 Estabilidad .....   | 136 |
| 4.4.7 Recuperación .....  | 139 |
| 4.4.8 Efecto matriz .....   | 140 |
| 4.4.10 Efecto memoria (Carry over) .....  | 143 |
| 4.4.11 Intensidad relativa de los iones .....   | 143 |
| 4.5 Aplicación de la metodología al análisis de muestras reales .....                                     | 144 |
| 4.5.1 Distribución socio-demográfica .....  | 144 |
| 4.5.2 Distribución geográfica .....   | 147 |
| 4.5.3 Distribución según características del hecho .....  | 148 |
| 4.5.3 Análisis de muestras forenses .....   | 153 |
| <b>5. Conclusiones y Recomendaciones</b> .....  | 168 |
| 5.1 Conclusiones .....  | 168 |
| 5.2 Recomendaciones .....   | 170 |
| <b>Bibliografía</b> .....   | 171 |
| A. Anexo: Aceptación de Residencia en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses .....   | 183 |
| B. Anexo: Aprobación cambio de Título .....   | 184 |
| C. Anexo: Aprobación del Comité de Ética .....  | 185 |
| D. Anexo: Datos para cálculo de parámetros de validación .....  | 186 |
| E. Anexo: Fórmulas para cálculos de los parámetros de validación .....                                    | 189 |
| F. Anexo: Casos forenses asociados con los plaguicidas en estudio .....                                   | 193 |

## Lista de figuras

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| <b>Figura 2-1:</b> Estructura química general de un organofosforado (Klaassen, 2008). .....   | 13          |
| <b>Figura 2-2:</b> Esquema general de la biotransformación de insecticidas dialqui, aril fosforotioatos. Tomado de (Klaassen, 2008). .....                                  | 14          |
| <b>Figura 2-3:</b> Estructura química del metamidofos. ....   | 18          |
| <b>Figura 2-4:</b> Estructura química del aldicarb. ....  | 24          |
| <b>Figura 2-5:</b> Metabolismo del aldicarb. Modificada de (Risher et al., 1987). ....  | 25          |
| <b>Figura 2-6:</b> Estructura química del carbofuran.....   | 28          |
| <b>Figura 2-7:</b> Metabolismo del carbofuran en mamíferos. Tomado de (Petropoulou, Gikas, Tsarbopoulos, & Siskos, 2006).....   | 29          |
| <b>Figura 2-8:</b> Sinapsis colinérgica donde se aprecia la participación de la acetilcolina. Tomado de (Flórez, 1997). ....  | 31          |
| <b>Figura 2-9:</b> Interacción de la acetilcolina, organofosforados y carbamatos con el sitio activo de la serina de la colinesterasa. Modificada (De Bleecker, 2008) ..... | 35          |
| <b>Figura 2-10:</b> Rangos aproximados de polaridad y tamaño del analito de acuerdo a las diferentes técnicas de ionización. Modificada de (Hocart, 2010). ....             | 56          |
| <b>Figura 2-11:</b> Diagrama funcional de bloques de un equipo LC-MS. (Thermo Electron Corporation, 2003). ....   | 57          |
| <b>Figura 2-12:</b> Ionización electrospray. Modificada de (Lopez, 2013). ....  | 58          |
| <b>Figura 2-13:</b> Formación del cono de Taylor en la ionización electrospray. Modificada de (Ekman et al., 2009). ....  | 58          |
| <b>Figura 2-14:</b> Corte transversal del sistema óptico del equipo LCQ Advantage Max. (Thermo Electron Corporation, 2003).....   | 60          |
| <b>Figura 2-15:</b> Corte transversal del analizador de masas. (Thermo Electron Corporation, 2003). ....  | 62          |
| <b>Figura 2-16:</b> Esquema de la disociación por colisión inducida (CID) en el analizador QIT para tándem en el tiempo. Modificada de (Hocart, 2010).....                  | 64          |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 2-17:</b> Corte transversal del sistema de detección de iones que muestra el electromultiplicador y el dinodo de conversión. (Thermo Electron Corporation, 2003). ...   | 66  |
| <b>Figura 2-18:</b> Modos scan de un instrumento tándem en el espacio como un QqQ. Modificada de (Hocart, 2010). .....  | 69  |
| <b>Figura 4-19:</b> Cromatograma obtenido para el aldicarb, carbofuran y metamidofos con sus respectivos estándares internos isotópicos deuterados. ....  | 107 |
| <b>Figura 4-20:</b> Espectro de masas obtenido del aldicarb.....  | 110 |
| <b>Figura 4-21:</b> Espectro de masas obtenido del aldicarb – d <sub>3</sub> .....  | 110 |
| <b>Figura 4-22:</b> Espectro de masas obtenido del carbofuran.....  | 111 |
| <b>Figura 4-23:</b> Espectro de masas obtenido del carbofuran- d <sub>3</sub> .....   | 111 |
| <b>Figura 4-24:</b> Espectro de masas obtenido del metamidofos. ....  | 112 |
| <b>Figura 4-25:</b> Espectro de masas obtenido del metamidofos- d <sub>6</sub> .....  | 112 |
| <b>Figura 4-26:</b> Cromatograma del método tándem para cada uno de los plaguicidas obtenidos tras el análisis de una muestra blanco de sangre de un occiso (A) y una muestra blanco de sangre de un donante vivo (B) .....   | 115 |
| <b>Figura 4-27:</b> Cromatogramas del método tándem para cada uno de los plaguicidas obtenidos tras el análisis de una muestra blanco de sangre (A) y un blanco de sangre con estándar interno isotópico deuterado (B). ..... | 116 |
| <b>Figura 4-28:</b> Cromatograma del método tándem para cada uno de los plaguicidas obtenido tras el análisis de una muestra de sangre con cocaína, benzoilecgonina y cocaetileno.....  | 118 |
| <b>Figura 4-29:</b> Curva de calibración en el sistema para el aldicarb, carbofuran y metamidofos.....  | 122 |
| <b>Figura 4-30:</b> Curva de calibración en el método para el aldicarb, carbofuran y metamidofos.....   | 122 |
| <b>Figura 4-31:</b> Cromatograma a una concentración de 0,10 µg/mL de cada uno de los plaguicidas aldicarb, carbofuran y metamidofos en sangre.....   | 129 |
| <b>Figura 4-32:</b> Gráficos de perfiles medios para el aldicarb. ....  | 131 |
| <b>Figura 4-33:</b> Gráficos de perfiles medios para el carbofuran. ....  | 133 |
| <b>Figura 4-34:</b> Gráficos de perfiles medios para el metamidofos. ....   | 134 |
| <b>Figura 4-35:</b> Porcentaje de occisos asociados a plaguicidas por grupos de edad. ....  | 145 |
| <b>Figura 4-36:</b> Distribución porcentual de muertes asociados a los plaguicidas en estudio según el género. ....   | 146 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 4-37:</b> Relación de muertes asociados a los plaguicidas en estudio según el género y edad. ....   | 147 |
| <b>Figura 4-38:</b> Distribución porcentual de muertes asociados aldicarb, carbofuran y metamidofos según el lugar de procedencia analizados. ....      | 147 |
| <b>Figura 4-39:</b> Porcentaje de occisos asociados a los plaguicidas en estudio de acuerdo a la manera de muerte. ....                                 | 148 |
| <b>Figura 4-40:</b> Relación de occisos de acuerdo a la manera de muerte y el género. ....  | 149 |
| <b>Figura 4-41:</b> Distribución porcentual de muertes asociados al tipo de plaguicida. ....  | 149 |
| <b>Figura 4-42:</b> Relación de muertes asociadas según el plaguicida y rango de edad. ....   | 150 |
| <b>Figura 4-43:</b> Relación de muertes asociados según el plaguicida y el género. ....   | 151 |
| <b>Figura 4-44:</b> Relación de muertes asociados a cada plaguicida y el lugar de procedencia. ....   | 152 |
| <b>Figura 4-45:</b> Relación de occisos de acuerdo a la manera de muerte y el plaguicida asociado. ....   | 153 |
| <b>Figura 4-46:</b> Cromatograma y espectro de masas del aldicarb y su estándar interno aldicarb-d <sub>3</sub> obtenido para el caso No 6. ....        | 160 |
| <b>Figura 4-47:</b> Cromatograma y espectro de masas del carbofuran y su estándar interno carbofuran-d <sub>3</sub> obtenido para el caso No 13. ....   | 160 |
| <b>Figura 4-48:</b> Cromatograma y espectro de masas del metamidofos y su estándar interno metamidofos-d <sub>6</sub> obtenido para el caso No 33. .... | 161 |
| <b>Figura 4-49:</b> Relación de muertes asociados al plaguicida y su concentración encontrada en sangre. ....   | 163 |
| <b>Figura 4-50:</b> Análisis de correspondencias de acuerdo a las categorías. ....  | 166 |
| <b>Figura 4-51:</b> Contribuciones absolutas al análisis de correspondencias de acuerdo a la categoría. ....  | 167 |
| <b>Figura 4-52:</b> Contribuciones absolutas al análisis de correspondencias de acuerdo a la manera de muerte. ....                                     | 167 |

## Lista de tablas

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| <b>Tabla 2-1:</b> Clasificación de toxicidad de acuerdo a la OMS. Modificada (WHO World Health Organization., 2010).....  | 8           |
| <b>Tabla 2-2:</b> Signos y síntomas según los receptores afectados y el sistema nervioso central (Peña, Perez, & Mahecha, 1990)(De Bleecker, 2008). ....  | 39          |
| <b>Tabla 2-3:</b> Intoxicación por organofosforados (OP) y carbamatos (CM). ....  | 40          |
| <b>Tabla 2-4:</b> Tipos de analizadores utilizados en espectrometría de masas. Modificada de (Hoffmann & Stroobant, 2007).....  | 61          |
| <b>Tabla 2-5:</b> Requerimientos de identificación para diferentes tipos de espectrómetros de masas. Modificada de (SANCO/12495/2011, 2011).....  | 85          |
| <b>Tabla 2-6:</b> Tolerancias máximas permitidas y recomendadas para la intensidad iónica relativa, usadas en un rango de técnicas espectrométricas. Modificada de (SANCO/12495/2011, 2011). .... | 86          |
| <b>Tabla 3-7 :</b> Estándares utilizados.....   | 89          |
| <b>Tabla 3-8:</b> Preparación de las soluciones madre de cada plaguicida.....   | 90          |
| <b>Tabla 3-9:</b> Procedimiento de análisis de muestra. ....  | 91          |
| <b>Tabla 3-10:</b> Programación del gradiente de elución de la fase móvil. ....   | 93          |
| <b>Tabla 3-11:</b> Resumen del estudio de validación de la metodología descrita.....  | 102         |
| <b>Tabla 4-12:</b> Condiciones del espectrómetro de masas optimizados. ....   | 108         |
| <b>Tabla 4-13:</b> Condiciones del método LC-MS/MS tándem utilizado en la detección de los compuestos en estudio.....   | 109         |
| <b>Tabla 4-14:</b> Transiciones características de los xenóticos analizados para la selectividad utilizando LC-MS/MS. ....  | 118         |
| <b>Tabla 4-15:</b> Estabilidad del tiempo de retención y tiempo de retención relativo en el sistema y el método.....  | 120         |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabla 4-16:</b> Datos de las curvas de calibración y resultados de la pruebas de hipótesis para el intercepto, pendiente y coeficiente de correlación para el sistema y método del aldicarb.....  | 125 |
| <b>Tabla 4-17:</b> Datos de las curvas de calibración y resultados de la pruebas de hipótesis para el intercepto, pendiente y coeficiente de correlación para el sistema y método para el carbofuran. ....   | 126 |
| <b>Tabla 4-18:</b> Datos de las curvas de calibración y resultados de la pruebas de hipótesis para el intercepto, pendiente y coeficiente de correlación para el sistema y método para el metamidofos.....   | 127 |
| <b>Tabla 4-19:</b> Límites de detección para cada compuesto de la metodología analítica....  | 128 |
| <b>Tabla 4-20:</b> Precisión (repetibilidad y precisión intermedia) y exactitud en el sistema y el método para la concentración del LOQ (0,10 µg/mL), concentración baja (0,25 µg/mL), concentración media (2,50 µg/mL) y ULOQ (5,00 µg/mL).....   | 130 |
| <b>Tabla 4-21:</b> Prueba de hipótesis de Kruskal Wallis para el aldicarb.....   | 132 |
| <b>Tabla 4-22:</b> Prueba de hipótesis de Kruskal Wallis para el carbofuran. ....  | 134 |
| <b>Tabla 4-23:</b> Prueba de hipótesis de Kruskal Wallis para el metamidofos.....  | 135 |
| <b>Tabla4-24:</b> Estabilidad a corto plazo a temperatura ambiente, a largo plazo bajo a refrigeración a 4 °C y en el automuestreador a 10 °C a una concentración de 0,25 µg/mL, expresado en porcentaje (%) respecto a la media de los valores obtenidos para las muestras control. ....  | 137 |
| <b>Tabla 4-25:</b> Estabilidad a corto plazo a temperatura ambiente, a largo plazo bajo a refrigeración a 4 °C y en el automuestreador a 10 °C a una concentración de 5,00 µg/mL, expresado en porcentaje (%) respecto a la media de los valores obtenidos para las muestras control. .... | 137 |
| <b>Tabla 4-26:</b> Porcentaje de recuperación obtenido según el nivel de concentración para cada plaguicida. ....  | 140 |
| <b>Tabla 4-27:</b> Efecto matriz determinado por el método de comparación de las pendientes. ....  | 140 |
| <b>Tabla 4-28:</b> Efecto matriz determinado por el método de la adición post-extracción.....  | 141 |
| <b>Tabla 4-29:</b> Intensidad relativa de iones.....   | 144 |
| <b>Tabla 4-30:</b> Casos forenses asociados con los plaguicidas en estudio del último trimestre del 2012. ....   | 154 |
| <b>Tabla 4-31:</b> Comparación de los resultados obtenidos en la matriz sangre y orina de los casos asociados a metamidofos. ....  | 163 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabla 4-32:</b> Resumen del modelo para el análisis de correspondencias múltiples de los casos forenses analizados. .... | 165 |
|---|-----|

## Lista de símbolos y abreviaturas

### Símbolos

| <b>Medida</b> | <b>Término</b>          | <b>Unidad SI</b> |
|---------------|-------------------------|------------------|
| Longitud      | Centímetros             | cm               |
| Longitud      | Milímetros              | mm               |
| Masa          | Gramos                  | g                |
| Masa          | Miligramos              | mg               |
| Masa          | Microgramos             | µg               |
| Volumen       | Litro                   | L                |
| Volumen       | Mililitro               | mL               |
| Temperatura   | Grados centígrados      | °C               |
| Tiempo        | Minutos                 | min              |
| Tiempo        | Segundos                | s                |
| Relación      | Masa/Carga              | m/z              |
| Relación      | Señal/Ruido             | S/N              |
| Relación      | Volumen/Volumen         | v/v              |
| Presión       | Pascal                  | Pa               |
| Masa Atómica  | Unidad de masa atómica  | uma              |
| Velocidad     | Revoluciones por minuto | rpm              |

### Subíndices

| <b>Subíndice</b> | <b>Término</b>  |
|------------------|---|
| LD <sub>50</sub> | Dosis Letal para un 50% de la población                           |
| LC <sub>50</sub> | Concentración Letal para un 50% de la población                   |
| t <sub>m</sub>   | Valor de t-student's calculado para la pendiente                  |
| t <sub>b</sub>   | Valor de t-student's calculado para el intercepto                 |
| t <sub>r</sub>   | Valor de t-student's calculado para el coeficiente de correlación |

## Abreviaturas

| Abreviatura | Término  |
|-------------|--|
| ACh         | Acetilcolina   |
| AChE        | Acetilcolinesterasa  |
| APCI        | Ionización Química a Presión Atmosférica   |
| API         | Ionización a Presión Atmosférica   |
| BuChE       | Butirilcolinesterasa   |
| CI          | Ionización Química   |
| CID         | Disociación por Colisión Inducida  |
| CIEX        | Clasificación Mundial de Enfermedades  |
| CM          | Carbamatos   |
| CV          | Coefficiente de Variación  |
| CYP         | Familia de citocromos P450   |
| DAD         | Detector de Arreglo de Diodos  |
| ECD         | Detector de Captura de Electrones  |
| EI          | Ionización por Impacto Electrónico   |
| EMA         | Agencia Medica Europea   |
| EPA         | Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos  |
| ESI         | Ionización por Electrospray  |
| FAO         | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura  |
| FD          | Detector de Fluorescencia  |
| FDA         | Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos  |
| FPD         | Detectores Fotométricos de Llama   |
| GC          | Cromatografía de Gases   |
| GC/MS       | Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas  |
| HFBA        | Heptafluorobutírico  |
| HILIC       | Cromatografía Líquida de Interacción Hidrofílica   |
| HPLC        | Cromatografía Líquida de Alta Resolución   |
| IARC        | Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer   |
| ICA         | Instituto Colombiano Agropecuario  |
| ICH         | Conferencia Internacional para la Armonización de Requerimientos Técnicos para el Registro de Fármacos para Uso Humano |
| IELC        | Cromatografía Líquida de Intercambio Iónico  |
| IMS         | Neurotoxicidad Intermedia o Síndrome Intermedio  |
| IPRPLC      | Cromatografía Líquida en Fase Reversa de Par Iónico  |
| IT          | Analizador de Trampa de Iones  |
| IUPAC       | Unión Internación de Química Pura y Aplicada   |
| LC          | Cromatografía Líquida  |
| LC/MS       | Cromatografía Líquida con Espectrometría de Masas  |
| LC-MS/MS    | Cromatografía Líquida con Espectrometría de Masas en Tándem  |
| LIT         | Trampa de Iones Lineal   |
| LLOQ        | Límite Inferior de Cuantificación  |
| LOD         | Límite de Detección  |
| ME          | Efecto Matriz  |
| MF          | Factor de Matriz   |
| MS          | Espectrómetro de Masas   |
| MS/MS       | Espectrometría de Masas en Tándem  |

|          |  |
|----------|--|
| NADPH    | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato              |
| NPD      | Detectores Específicos de Nitrógeno Fósforo            |
| NTE      | Estereasa Diana de Neuropatía                          |
| ODS      | Octadecilsilano  |
| OMS      | Organización Mundial de la Salud                       |
| OP       | Organofosforados                                       |
| OPIDP    | Polineuropatía Retrasada Inducida por Organofosforados |
| PB       | Ionización por Haz de Partículas                       |
| QC       | Control de Calidad                                     |
| QIT      | Analizador de cuadrupolo de trampa de Iones            |
| Q-TOF    | Cuadrupolo con Tiempo de Vuelo                         |
| RF       | Radiofrecuencia  |
| RPLC     | Cromatografía Líquida en Fase Reversa                  |
| RSD      | Desviación Estándar Relativa                           |
| SAX      | Cromatografía de Intercambio Aniónico                  |
| SCX      | Cromatografía de Intercambio Catiónico                 |
| SI       | Estándar Interno                                       |
| SIM      | Adquisición de un Ion Seleccionado                     |
| SRM      | Adquisición de la Reacción Monitoreada                 |
| TBA      | Tetrabutylamonio                                       |
| TOF      | Analizador de Tiempo de Vuelo                          |
| TQ ó QqQ | Triple Cuadrupolo                                      |
| TR       | Tiempo de Retención                                    |
| TRR      | Tiempo de Retención Relativo                           |
| TSP      | Ionización por Termospray                              |
| ULOQ     | Límite Superior de Cuantificación                      |
| UV       | Ultravioleta   |

## Introducción

Los plaguicidas son sustancias químicas que han sido ampliamente utilizadas en el mundo para la eliminación y control de plagas. Si bien su empleo ha evitado la disminución del volumen y calidad de la producción alimentaria, su uso indiscriminado ha generado consecuencias adversas sobre los ecosistemas y la salud humana debido a sus características tóxicas, persistentes y bioacumulativas (WHO World Health Organization., 2010).

La intoxicación aguda con plaguicidas representa una preocupante problemática de salud pública a nivel mundial. Los plaguicidas han sido responsables de intoxicaciones fatales en mayor proporción en los países subdesarrollados que en los desarrollados, ya sea en circunstancias accidentales o en situaciones homicidas o suicidas (Gunnell, Eddleston, Phillips, & Konradsen, 2007). Gunnell señala en su trabajo que los suicidios debido a intoxicación aguda por plaguicidas representan el 30% de los suicidios mundiales (Gunnell & Eddleston, 2003).

Esta problemática no está alejada a la realidad colombiana, que se refleja no sólo en las estadísticas del Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública SIVIGILA con 9.130 intoxicaciones a causa de plaguicidas durante el año 2011, sino también en las muertes documentadas por intoxicación donde se cobija a los plaguicidas durante el mismo año por el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Estos datos epidemiológicos reportan que la intoxicación como mecanismo causal estuvo involucrada en 113 muertes violentas indeterminadas, 5 homicidios, 391 suicidios y 62 muertes accidentales. (INS Instituto Nacional de salud, 2012)(Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses., 2012).

Las investigaciones de intoxicación por plaguicidas en nuestro país se han basado en estudios epidemiológicos asociados a la ingesta o exposición a estas sustancias,

enfocados al reconocimiento de las manifestaciones clínicas para su diagnóstico y tratamiento (A, Mancipe, & Diana, 2010) (Idrovo, 2000) (González Vides, 2011) (Hurtado C., 2005)(Gutiérrez, 2008) (Russi & Rincón, n.d.). En el campo ocupacional, la exposición a plaguicidas se ha evaluado a través del monitoreo citogenético y mediante la determinación de la actividad de la colinesterasa en trabajadores (Cárdenas, Silva, Morales, & Ortiz, 2005) (Carmona-fonseca, 2003). Estos estudios generan aportes en el ámbito de la toxicología clínica y la toxicología ocupacional del país, sin embargo, no aplican en el campo de la toxicología forense en el sentido de contribuir a determinar la causa de muerte, a no ser que sean circunstancias previas al fallecimiento.

La contribución de la toxicología forense con la medicina forense no sólo se enmarca en proporcionar resultados de los hallazgos toxicológicos que permitan la precisión de la causa de muerte, sino que su propósito directo es la resolución científica de un problema judicial. Desde esta perspectiva, y en el contexto del sistema penal acusatorio en nuestro país, es imperativo contar con resultados soportados en metodologías analíticas validadas que suministre datos analíticos confiables. En efecto, resultados obtenidos de estos métodos brinda certeza del análisis a la autoridad solicitante, faculta al perito forense a una sustentación clara, segura y convincente de su informe pericial en los tribunales y lo más importante da a lugar a consecuencias legales justificadas a un indiciado.

En el campo de la toxicología postmortem, cuando se sospecha que la muerte ha sido provocada por un agente tóxico, la concentración de éste en la sangre en el momento del deceso es uno de los parámetros más importantes para determinar la causa de muerte y suministra elementos probatorios al sistema judicial para definir la manera de muerte (Bell, 2013). Aunque a nivel epidemiológico, en algunos casos se conoce el plaguicida que está involucrado en la intoxicación aguda gracias al registro de la historia clínica, en muchos otros casos no se alcanzó a recibir atención médica y/o se desconoce el plaguicida implicado y en qué concentración se encuentra para explicar si estuvo asociado a la muerte.

En este sentido, a nivel internacional se ha avanzado con estudios que determinan plaguicidas en fluidos biológicos como sangre, orina y plasma por diversas técnicas analíticas, con el objetivo de establecer la relación del plaguicida con la muerte o definir

en qué paso de su recorrido toxicocinético se encuentra (Park et al., 2009)(Brown et al., 1996)(Lacassie, Dreyfuss, et al., 2001) (Asri Kamarruddin, 2000)(Dulaurent, Moesch, Marquet, Gaulier, & Lachâtre, 2010)(Salihovic et al., 2012)(Tarbah, Mahler, Temme, & Daldrup, 2001)(Ameno et al., 2001)(Salm, Taylor, Roberts, & De Silva, 2009)(Kudo et al., 2012)(Inoue et al., 2007). Dentro de los plaguicidas frecuentemente encontrados en el mundo asociados con intoxicaciones fatales se encuentran los organofosforados, carbamatos y piretrinas (Park et al., 2009) (Lacassie, Dreyfuss, et al., 2001) (Salm et al., 2009) (Kudo et al., 2012)(Soltaninejad, Faryadi, & Sardari, 2007)(Wesseling, Corriols, & Bravo, 2005).

A nivel nacional, en el ámbito de la toxicología forense las investigaciones de la determinación de plaguicidas en muestras biológicas son escasas, a pesar del número de occisos y circunstancias accidentales que se presentan por estas sustancias en ambientes rurales y urbanos de nuestro país (Castro & Mora, 2006) (Mora, 2007)(Castro & Rodríguez, 2005)(Ortiz & Ochoa, 2010). Estos estudios sectoriales desarrollados en la Regional Bogotá y en Bucaramanga revelan que entre los plaguicidas frecuentemente encontrados en intoxicaciones fatales están los organofosforados (diclorvos, metamidofos y dimetoato) y los carbamatos (carbofurano, propoxur, metomil y aldicarb), detectados mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en forma cualitativa. No hay estudios que indiquen la concentración de un carbamato u organofosforado en sangre de occisos y su relación con la manera de muerte que ilustre la casuística de nuestro país.

En esta búsqueda de proporcionar pautas a nivel toxicológico que permitan precisar la causal de muerte asociada con la determinación de organofosforados y carbamatos, es necesario desarrollar metodologías de análisis que permita detectar, identificar y cuantificar estos compuestos en muestras de sangre con certeza y con límites de detección bajos. Más aun cuando los niveles podrían disminuir considerablemente debido a factores tales como: procedimientos llevados a cabo al intoxicado a manera de tratamiento médico, descomposición del analito en la matriz biológica inducido por el tiempo transcurrido entre la muerte y la toma de la muestra en la necropsia, y entre la necropsia y el desarrollo del análisis toxicológico (Ageda, Fuke, Ihama, & Miyazaki, 2006).

La aplicación de una metodología que determine cualitativa y cuantitativamente organofosforados y carbamatos requiere de la selección de una técnica sensible y selectiva. Actualmente se ha empleado la técnica de Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS) válida para estos fines, sin embargo; esta técnica está limitada para compuestos volátiles, de bajo peso molecular y termoestables.

Por su parte, la técnica de cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) presenta un rango más amplio de compuestos para análisis, así como mejor respuesta en sensibilidad y detección. Además que facilita el estudio de manera simultánea de los metabolitos o productos de degradación, sin tener que derivatizar (Alder & Greulich, 2006)(Hernández, Sancho, & Pozo, 2005)(Maurer, 2007). En efecto, es apta para compuestos termolábiles, situación que favorece a los plaguicidas con estas características fisicoquímicas como por ejemplo el aldicarb. La LC-MS/MS se encuentra en auge a nivel clínico y forense en el mundo.

Este trabajo busca desarrollar y validar el método analítico empleando la técnica LC-MS/MS, para luego ser aplicado al análisis de las muestras de sangre donde se presume intoxicación aguda por alguno de los plaguicidas aldicarb, carbofurano y metamidofos de occisos de casos forenses de la ciudad de Bogotá y los departamentos de Cundinamarca y Boyacá durante el último trimestre del 2012. Se pretende de igual forma proveer una metodología analítica para los plaguicidas en estudio que brinde confiabilidad y seguridad de los resultados y constituya una importante herramienta analítica para el análisis de casos futuros. De este modo, se obtendrá resultados toxicológicos fundamentados en el rigor científico que proporcionará evidencia para resolver una situación judicial y permitirá al perito forense la sustentación de su reporte en forma clara, convincente y segura en el momento de su presentación ante la corte.

Se establece entonces los cimientos con el análisis de aldicarb, carbofurano y metamidofos en sangre utilizando LC-MS/MS y se motiva hacia la ampliación del método a un mayor número de plaguicidas, en respuesta a la casuística de intoxicación por estos productos en Colombia.

Los plaguicidas en estudio se seleccionaron basados en los reportes oficiales de estudios toxicológicos forenses previos, la información existente de vigilancia epidemiológica y al

reconocimiento del carácter tóxico de estos productos. Los lugares de procedencia se eligieron en virtud de la accesibilidad de las muestras puesto que llegan al Laboratorio de Toxicología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses sede Bogotá, así como al uso variado de estos plaguicidas en los cultivos de la región y control de plagas en el hogar (ICA Instituto Colombiano Agropecuario, 2011).

Este trabajo en muestras de sangre de casos forenses, no sólo contribuye a la definición de la causa de la muerte como respuesta a la problemática de salud pública de intoxicación aguda por organofosforados y carbamatos cuya importancia se debe revelar, sino que además representa un aporte técnico y científico a la administración de justicia soportado en la toxicología forense y analítica.

# 1. Objetivos

## 1.1 Objetivo general

Determinar los niveles de aldicarb, carbofurano y metamidofos en muestras de sangre de casos forenses provenientes de la ciudad de Bogotá y los departamentos de Cundinamarca y Boyacá durante el último trimestre del 2012, mediante cromatografía líquida con espectrometría de masas tándem LC-ESI-MS/MS.

## 1.2 Objetivos específicos

- Desarrollar y validar un método analítico nuevo para la determinación y cuantificación de aldicarb, carbofurano y metamidofos en sangre por LC-ESI-MS/MS.
- Cuantificar los plaguicidas aldicarb, carbofurano y metamidofos de las muestras de sangre de casos forenses provenientes de Bogotá y los departamentos de Cundinamarca y Boyacá durante el último trimestre del 2012 relacionados con la intoxicación de estos plaguicidas.
- Relacionar las variables como: género y lugar con el plaguicida aldicarb, carbofurano y metamidofos encontrado en los casos forenses seleccionados.
- Describir los hallazgos postmortem de interés toxicológico de los casos donde se haya detectado y cuantificado alguno de los plaguicidas en estudio y se encuentre disponible la información.

## 2. Marco Conceptual

### 2.1 Plaguicidas

La Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura (FAO) define como plaguicida “Cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicios o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte” (Organización Mundial de la Salud OMS, 2003a).

Los plaguicidas se pueden clasificar de acuerdo a su toxicidad, su mecanismo de acción, el tipo de aplicación y el grupo químico al que pertenecen. Otra clasificación es la referida en virtud a los organismos vivos que controlan o están dirigidos, en varios grupos así: insecticidas (controlan insectos), fungicidas (controlan hongos), herbicidas (controlan plantas o hierbas malas), acaricidas (controlan ácaros), molusquicidas (control de moluscos), nematocidas (controlan nematodos) y rodenticidas (controlan roedores) (Moffat & Osselton, 2011).

De acuerdo al grupo químico al que pertenecen se dividen principalmente en: organofosforados, carbamatos, organoclorados, piretrinas y piretroides, y compuestos arsenicales. Los insecticidas se pueden clasificar en ocho grupos químicos, de los cuales

los siguientes cinco son los más importantes: organofosforados, carbamatos, hidrocarburos clorados, piretroides y derivados de urea. Otro grupo de insecticidas son los compuestos heterocíclicos. Los herbicidas por su parte pueden clasificarse en doce grupos químicos, de los cuales, los siguientes siete son los más importantes: ácidos fenoxiclorados, derivados de urea, triazinas, uracilos, compuestos de amonio cuaternario, carbamatos, ácidos carboxílicos y ésteres. Otros herbicidas incluye a las amidas, organofosforados y compuestos organoarsenicales. Los fungicidas pueden ser: benzimidazoles, ditiocarbamatos y organofosforados. Los rodenticidas pueden ser: fosfinas, sales de talio y usualmente sulfatos; y anticoagulantes cumarínicos. Por último, los acaricidas, molusquicidas y nematocidas incluyen niclosamida (molusquicida) y forato (nematocida). Es posible encontrar en las clasificaciones anteriores la condición que un producto tiene más de una aplicación (Moffat & Osselton, 2011).

De acuerdo a su toxicidad, la OMS clasifica a los plaguicidas con base en las determinaciones de los procedimientos estándar en toxicología que principalmente definen la toxicidad aguda oral y dérmica en las ratas. Por lo tanto, utiliza la LD<sub>50</sub> expresada como mg/Kg de peso corporal como criterio de clasificación (Ver tabla 2-1) (WHO World Health Organization., 2010).

**Tabla 2-1:** Clasificación de toxicidad de acuerdo a la OMS. Modificada (WHO World Health Organization., 2010).

| Clase OMS  | Clasificación            | LD <sub>50</sub> para ratas (mg/Kg peso corporal) |                  |
|------------|--------------------------|---|------------------|
|            |                          | Oral  | Dérmica          |
| <b>Ia</b>  | Extremadamente peligroso | < 5   | < 50             |
| <b>Ib</b>  | Altamente peligroso      | 5 - 50  | 50 - 200         |
| <b>II</b>  | Moderadamente Peligroso  | 50 – 2.000  | 200 – 2.000      |
| <b>III</b> | Ligeramente Peligroso    | Superior a 2.000                                  | Superior a 2.000 |
| <b>U</b>   | No presenta riesgo agudo | 5.000 o mayor                                     |                  |

La toxicidad de un plaguicida va a estar gobernada por su estructura química, sus propiedades fisicoquímicas y por las características que comprenden su toxicología como lo son: vías de exposición, particularidades del ser humano, condiciones ambientales de temperatura, altitud, luz y otras radiaciones; que facilitan o inhiben su absorción y bioacumulación (García & Repetto, 2008).

## 2.1.1 Intoxicación aguda por plaguicidas

Organizaciones internacionales se han preocupado por dictar disposiciones en la producción, uso y comercialización de plaguicidas, tales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) que establece las directrices sobre la gestión de estos productos para la salud pública y la Agencia Medioambiental Norteamericana (EPA) que regula el uso de los plaguicidas bajo la autoridad de la Ley Federal sobre insecticidas, fungicidas y rodenticidas entre otras (WHO World Health Organization., 2010). Sin embargo, los plaguicidas por sus características fisicoquímicas, toxicocinéticas, toxicodinámicas y su mal empleo, han estado involucrados en efectos tóxicos tanto agudos como crónicos sobre el ser humano, enfatizando la atención en casos fatales por intoxicación aguda debido a la ingestión accidental o la ingestión con propósitos suicidas u homicidas.

### ▪ Nivel internacional

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que los casos por intoxicaciones agudas por plaguicidas tienen una incidencia anual en países desarrollados de 18,2 trabajadores agrícolas por cada 100.000 trabajadores de tiempo completo y 7,4 por cada millón de niños escolares. Las estrictas regulaciones internacionales de los países desarrollados para la producción, almacenamiento, venta, uso y disposición final de los plaguicidas resultan en una restricción de su disponibilidad y en efecto; en una disminución de los casos fatales asociados a estas sustancias. (Roberts et al., 2003) (Gunnell & Eddleston, 2003) (Manuweera, Eddleston, Egodage, & Buckley, 2008) (Dawson et al., 2010).

A diferencia de los países desarrollados, el uso de plaguicidas con fines suicidas, en los países en desarrollo es considerado un factor importante en los patrones de morbilidad y mortalidad. En zonas rurales de China, por ejemplo, los suicidios están asociados a plaguicidas en un 60%, en Sri Lanka en un 71%, en Trinidad en un 68% y en Malasia es mayor al 90%. (Gunnell & Eddleston, 2003).

En Australia las intoxicaciones agudas fatales con plaguicidas fueron de 81 casos entre 1997 y el 2001, con un 77% con propósitos suicidas que representa el 0,54% de los suicidios en este país. Para el 2002 se presentó una situación similar, ya que el 0,52% de

los suicidios se explicaron por la ingesta de plaguicidas. Los grupos de plaguicidas involucrados en el mayor número de muertes son los carbamatos y organofosforados. (Fragar LG, Sankaran B, 2005).

A partir de una revisión epidemiológica entre los años de 1990 y 2007 de la distribución global de intoxicaciones fatales por plaguicidas, se tiene un estimativo mundial de suicidios anuales de 258.234 (rango: 233.997-325.907) que representa el 30% (rango: 27% - 37%) de los suicidios globales. Los estimativos de suicidios por plaguicidas, por regiones para el 2007 fueron: Europa: 3,7%, América: 4,9%, Este del Mediterráneo: 16,5%, África: 22,9%, Sureste de Asia: 20,7% y Oeste pacífico de Asia: 5,8%. Así mismo, se menciona que las intoxicaciones fatales por plaguicidas no necesariamente están sujetas a la cantidad vendida por región. Por ejemplo, aunque Europa vende el 29% del mercado mundial solamente presenta el 2% (correspondientes a 6.080 de 258.234) de suicidios reales con plaguicidas, mientras que Asia, con un 25% del mercado mundial, registra el 91% de los suicidios (235.620/258.234). Además se enuncia que las dos terceras partes de los plaguicidas ingeridos en Asia corresponden a organofosforados. (Gunnell et al., 2007).

Estudios sectorizados y más actualizados como el realizado en América Central (El Salvador y Nicaragua) muestran una incidencia de 35 intoxicaciones agudas por plaguicidas de cada 100.000 personas de la población general, en Tailandia un 17,8 por cada 100.000 trabajadores y en Belize ocurren 17 intoxicaciones por plaguicidas por cada 100.000 residentes. La investigación anterior ha demostrado que, para los países en vía de desarrollo, las intoxicaciones por plaguicidas por causas ocupacionales y accidentales varían entre el 10% y el 50% respecto a las totales (Thundiyil, 2008).

Son escasos los datos de intoxicaciones agudas fatales en América del sur. En Brasil por ejemplo en el 2004 se registraron 553 suicidios asociados a plaguicidas que representan el 6,9% del total de suicidios. En Ecuador, se registró en áreas rurales 5 suicidios por plaguicidas, en Suriname 10 de cada 20 suicidios se asocian a estos compuestos y se considera que los plaguicidas son comúnmente utilizados para infringir daño en la ciudad de la Paz. (Gunnell et al., 2007).

## ▪ Nivel nacional

Colombia no es ajena a esta situación puesto que la intoxicación aguda por plaguicidas es un problema de salud pública. Según el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) se presentaron 9.130 intoxicaciones a causa de plaguicidas durante el año 2011 en todo el país (INS Instituto Nacional de salud, 2012). El Departamento con mayor incidencia de intoxicación es Antioquia seguido por Valle, Huila y en cuarto lugar la ciudad de Bogotá con 977, 785, 754 y 650 casos respectivamente. Estas cantidades representan en orden consecutivo el 10,7%, 8,6%, 8,3% y 7,1% de los casos del país. Los departamentos de Boyacá y Cundinamarca, ocuparon los puestos once con 347 casos, y doce con 325 casos respectivamente, que representan el 3,8% y 3,6% de los casos totales del país. Estos datos de intoxicación clínica por plaguicidas fueron importantes a nivel toxicológico debido a que si un caso no fue diagnosticado correctamente a tiempo para recibir el tratamiento adecuado, se hubiese convertido en una intoxicación fatal.

La intoxicación aguda con plaguicidas es una causa de mortalidad. En este sentido, el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses (INML-CF) reportó que durante el 2011 en Colombia las intoxicaciones por agentes químicos, donde se involucran los plaguicidas fueron causantes de muertes accidentales en 62 casos, homicidios 5 casos, violentas indeterminadas 113 y suicidios 391 casos. De las 1.889 necropsias con posible manera de muerte el suicidio, un aumento de 25 casos (1,3 %) en relación con el año anterior muestran a la intoxicación como el mecanismo causal más utilizado por las mujeres (138 casos, 37,70%), mientras que como método de suicidio en los hombres ocupó el tercer lugar (253 casos, 16,61%) después del ahorcamiento (685 casos, 44,98%) y el proyectil de arma de fuego (16,87%). (Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses., 2012).

Por su parte el Grupo de Toxicología de la Regional Bogotá del mismo instituto estima en su base de datos que de las muertes causadas por plaguicidas en Bogotá en el 2011, el 88% corresponden a carbamatos y el 12% a organofosforados. Entre los carbamatos involucrados se encuentran el aldicarb (47%) y el carbofurano (35%) (Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, 2011).

En los departamentos de Cundinamarca (no incluye Bogotá) y Boyacá, se estima que las intoxicaciones fatales por plaguicidas durante el 2011 corresponden principalmente a carbamatos (62,5%) y organofosforados (37,5%). El carbofurano es el carbamato que predomina con el 47,5% de los casos, seguido por el organofosforado metamidofos con el 17,5% de los casos. El aldicarb representa el 5% de las muertes de estos lugares de procedencia (Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, 2011).

Las estadísticas del SIVIGILA en la Ciudad de Bogotá D.C. durante el año 2011 presentan 709 intoxicaciones por plaguicidas reportadas en los centros de salud, con 379 de ellas atribuibles posiblemente al aldicarb, el cual es vendido como rodenticida; cifra que corresponde al 53,2 % de los casos ocurridos en la ciudad. El segundo lugar, con un 8,7% fue ocupado por plaguicidas desconocidos, el 8,6% por raticidas, el 7,3% por organofosforados y en octavo lugar con un 1,8% por carbamatos (sin especificar el compuesto y diferentes al aldicarb). Estos datos de la ciudad de Bogotá evidencian que la intoxicación con plaguicidas no es exclusivo de las zonas rurales sino que incluso ocurre en las zonas urbanas, condición entendida por la venta libre de estos productos que hacen fácil su adquisición y favorece la presencia especialmente de los organofosforados y carbamatos como herbicidas, insecticidas y rodenticidas no sólo en la industria agrícola, sino también en el hogar.

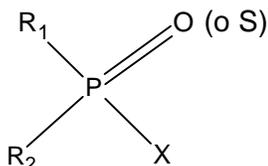
En cuanto a la edad, es importante mencionar que durante el 2011 se presentaron 421 muertes accidentales en niños menores de 10 años. Aunque no se especifica cuántos de ellos son asociados a plaguicidas, se sabe que definitivamente estos constituyen un mecanismo causal de muerte (Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses., 2012). Estos datos tienen un gran valor social en cuanto la muerte en esta etapa de la vida de forma accidental puede ser evitada por prevención en el hogar y es de repercusión en forense, ya que los padres tienen la responsabilidad legal ante este hecho por ser los encargados de su cuidado.

Si bien, la vigilancia epidemiológica expone la intoxicación aguda por plaguicidas como un fenómeno que afecta la salud y si no es atendida a tiempo podría causar la muerte ya sea en casos accidentales, homicidios o suicidios en nuestro país, es la toxicología forense en poder de sus profesionales la que da certeza de esta conclusión mediante la detección y cuantificación de estos compuestos en fluidos biológicos del occiso.

## 2.2 Plaguicidas organofosforados

Los organofosforados son compuestos orgánicos con una estructura química caracterizada por un átomo de fósforo pentavalente, el cual es tetracoordinado. Algunos compuestos tienen un átomo de oxígeno unido al fósforo por doble enlace y dos sustituyentes de éster. En los tionofosforados al átomo de fósforo se le une un azufre por doble enlace y uno de los otros dos oxígenos puede ser reemplazado por otro azufre. El sustituyente X, es un buen grupo saliente y puede ser: un grupo que contiene nitrógeno cuaternario, un átomo de flúor u otro halógeno, un grupo ciano o tiociano, o un grupo alquilo, alcoxi, alquiltio, arilo o heterociclo (Figura 2-1). (Boelsterli, 2003).

**Figura 2-1:** Estructura química general de un organofosforado (Klaassen, 2008).



Entre los organofosforados más representativos se encuentran: fenitrotión, dimetoato, diclorvos, triclofon, metamidofos, clorpirifos, diazinon, etión, fentiión y cumafós entre otros. Los organofosforados tienen una alta toxicidad aguda, su LD<sub>50</sub> en ratas está por debajo de 50 mg/Kg por vía oral, además también tienen alta toxicidad vía dérmica (Klaassen, 2008)

### 2.2.1 Toxicocinética de organofosforados

#### ▪ Absorción

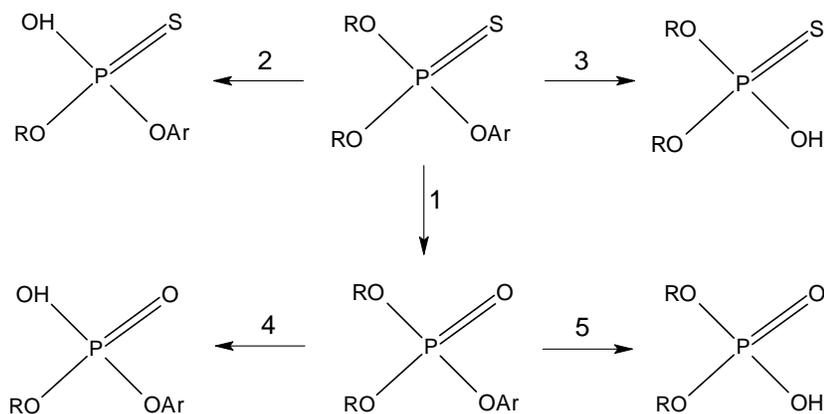
Los plaguicidas organofosforados se absorben por vía oral, dérmica o inhalatoria. En general, una absorción inhalatoria va acompañada de una absorción dérmica característica de una exposición ocupacional. La absorción dérmica es lenta y se facilita su ingreso al organismo debido a la propiedad lipofílica de los plaguicidas organofosforados, así como de su formulación (solventes, coadyudantes etc.).

## ▪ Distribución y metabolismo

Los plaguicidas organofosforados se distribuyen de forma rápida en el organismo y se acumulan en el tejido adiposo, hígado, riñones, músculo y glándulas salivares. Atraviesan la barrera hematoencefálica y la placentaria. Las rutas de metabolización son altamente específicas y dependen del grupo funcional sustituyente X unido a la estructura del éster. Así mismo, la vida media puede variar de horas a días dependiendo de la configuración química de cada plaguicida organofosforado, de su absorción y distribución.

La biotransformación en la fase I, se lleva a cabo mediante reacciones de bioactivación y de reacciones de detoxificación (Ver figura 2-2) (Klaassen, 2008).

**Figura 2-2:** Esquema general de la biotransformación de insecticidas dialqui, aril fosforotioatos. Tomado de (Klaassen, 2008).



Reacción 1 de bioactivación por desulfuración oxidativa del compuesto inicial al metabolito activo, el oxon. Las demás reacciones generan productos que no inhiben la acetilcolinesterasa. Las reacciones 2 y 4 son de desalquilación mientras que la 3 es de desarilación, mediadas estas tres por citocromo P450. Reacción 5 es de carácter hidrolítico catalizada por paraoxonasa. No todas las reacciones ocurren con todos los plaguicidas.

## ▪ Reacciones de bioactivación

Existen diferentes reacciones de bioactivación de los compuestos organofosforados, pero las de mayor importancia para los plaguicidas organofosforados son:

Desulfuración oxidativa: Es la reacción que se presenta en los organofosforados que tienen el átomo de azufre unido al átomo de fósforo S=P y debido a la acción de las enzimas del citocromo P450 (CYPs) del hígado, conduce a la formación del enlace O=P llamado "oxon". Este proceso resulta en un incremento significativo de la toxicidad. Un ejemplo característico de esta activación se observa con el paratión, el cual es un plaguicida que inhibe la enzima AChE de forma débil, mientras que su producto de biotransformación el paraoxón es un fuerte inhibidor de la AChE.

La acción que ejerce el citocromo en este metabolismo se encuentra actualmente estudio, por ejemplo el diazinon es activado por el citocromo humano hepático CYP2C19, mientras que el paratión es activado inicialmente por CYP3A4/5 y luego por CYP2C8, así mismo el clorpirifos es activado por el citocromo CYP2B6. El producto oxon es un intermedio que puede ser hidrolizado por hidrolasas aril y alifáticas que se encuentran en mamíferos, entretanto los insectos carecen de estas enzimas y son más susceptibles a estos agentes (Klaassen, 2008).

Oxidación del tioéter: Ocurre en la fracción restante del grupo saliente del organofosforado para la formación del enlace S=O sulfóxido y posteriormente la formación de la sulfona O=S=O. Esta reacción también es catalizada por CYPs. Estos metabolitos sulfóxido y sulfona son bioactivos toxicológicamente.

### ▪ Reacciones de destoxicación

Las reacciones bioquímicas de destoxicación de los plaguicidas organofosforados son aquellas en donde los productos de la biotransformación no inhiben la acción de la AChE o conducen a metabolitos de menor toxicidad. Esta destoxicación metabólica se debe principalmente al rompimiento de los enlaces con el átomo de fósforo, que genera una carga negativa en la molécula y por ende impide su acción como agente anticolinesterásico. Los metabolitos formados son polares hidrosolubles y se pueden eliminar fácilmente por vía urinaria.

Desarilación y desalquilación oxidativa: Se llevan a cabo con enzimas que utilizan coenzimas como la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH<sup>+</sup>). De este modo la coenzima NADPH<sup>+</sup>, el sistema citocromo P450 (CYPs) y la (NADPH<sup>+</sup>) regenerada son

los que proporcionan los electrones y oxígenos necesarios para la formación de los metabolitos polares.

La desmetilación con la formación de un grupo aldehído es fácilmente obtenida, sin embargo, la desalquilación se desfavorece entre más larga sea la cadena carbonatada del grupo alquil. En forma similar, ocurre con la desarilación que se produce con la formación de un grupo fenol y un ácido dialquilfosfórico o dialquilfosforotioato. Ejemplos de esta reacción de detoxificación se encuentra la desarilación del clorpirifos catalizada por el CYP2C19 y la del paratión por el CYP2B6.

Como en el caso de las reacciones de bioactivación, en las reacciones de detoxificación también existen diferencias entre el tipo de CYPs que intervienen en los procesos de detoxificación.

Reacciones de hidrólisis enzimática: Son hidrólisis catalizadas por fosfotriesterasas conocidas como las A-esterasas, que no son inhibidas por los organofosforados y generalmente hidrolizan los aril esterés de cadena corta alifáticos o ácidos fosfóricos. Un ejemplo de esta reacción son las hidrólisis del paraoxón, clorpirifos y el diazinon, catalizadas por la enzima paraoxonasa.

El sistema de monooxigenasas son capaces de catalizar varias reacciones de los organofosforados que involucran sus grupos sustituyentes como: hidroxilación del anillo aromático, oxidación del tioéter, desaminación, alquil y N-hidroxilación, formación de un N-óxido y N-desalquilación.

Las reacciones catalizadas por transferasas que usan glutatión como cofactor y aceptor para los grupos O-alquil y O-aril para obtener productos de monodesmetil y S-metilglutatión o ácidos dialquilfosfórico o dialquilfosforotioato y derivados del aril-glutatión. Es decir, las S-transferasas de glutatión ayudan a la detoxificación de los organofosforados, en especial donde se encuentra un grupo metoxi.

Las reacciones catalizadas por las carboxilesterasas son capaces de hidrolizar ésteres alifáticos y de aril de cadena corta de ácidos grasos. La reacción más representativa en este caso es la del malatión donde las carboxilesterasas realizan una hidrólisis catalítica

de los ésteres carboxílicos, lo que explica su baja toxicidad en mamíferos. Mientras que en insectos, la actividad de las carboxilesterasas es baja y la hidrólisis es más lenta, por esta razón, el malatión es bien tóxico para estos.

En la fase II comprendida por las reacciones de conjugación, son limitadas en el proceso de biotransformación de los plaguicidas organofosforados. Básicamente se ciñen a la formación del glucorónido o del sulfato a partir de los fenoles, cresoles y otras sustancias hidrolizadas del éster. Un ejemplo de esta reacción es la del plaguicida organofosforado clorfenvinfos, que refleja en su metabolismo productos conjugados de glucorónido y de glicina (Klaassen, 2008).

### ▪ **Eliminación**

Los plaguicidas organofosforados se eliminan vía urinaria cuando su biotransformación ha generado metabolitos hidrosolubles, sin embargo; se han adelantado estudios donde la liposolubilidad de los plaguicidas organofosforados hacen que permanezcan más de 48 horas en el organismo probablemente a causa de una redistribución desde el tejido adiposo hacia la sangre, incluso cuando se han tratado los síntomas iniciales (García & Repetto, 2008).

## **2.2.2 Metamidofos**

El metamidofos es un tioorganofosfato utilizado como acaricida e insecticida. Es un inhibidor de la colinesterasa que se emplea en la agricultura desde 1970 (Baselt, 2004)(Moffat & Osselton, 2011).

### ▪ **Propiedades Físico-Químicas**

Metamidofos es un sólido cristalino blanco con un fuerte olor a mercaptano. Es un compuesto muy polar.

**Punto de fusión:** 54°C

**Presión de vapor:**  $3,53 \times 10^{-5}$  mm Hg a 25°C

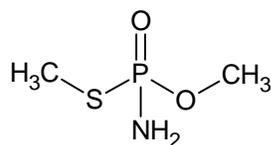
**Solubilidad:** Soluble en agua, alcoholes, hidrocarburos clorados alifáticos y relativamente poco soluble en éter.

**Fórmula molecular:** C<sub>2</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub>PS = 141,1 g/mol

**Nombre IUPAC:** Amino-metilsulfanil-fosforil-oximetano.

**Marca registrada:** Filitox, Metikar, Monitor, Nitofol, Nuratron, Patrol, Pillaron, Tam, Tamanox, Tamaron y Vetaron entre otros (Krieger, 2010)(Moffat & Osselton, 2011).

**Figura 2-3:** Estructura química del metamidofos.



La EPA lo cataloga en la categoría *I* como sustancia altamente tóxica para toxicidad aguda por vía oral y respiratoria de acuerdo a los estudios hechos en ratas; y en la misma categoría *I* para toxicidad aguda por vía dérmica de acuerdo a los estudios hechos en conejos (EPA, 2006). La Organización Mundial de la Salud OMS clasifica al metamidofos en el grupo *Ib* como altamente peligroso (Moffat & Osselton, 2011).

El metamidofos se utiliza para controlar insectos en los cultivos de alfalfa, papa, algodón y tomate. Es un insecticida de amplio espectro para el control del pulgón, el escarabajo de la papa de Colorado, el pulgón verde del melocotonero, los saltamontes, el minador de la hoja, los chinches, las lombrices intestinales del tomate y la mosca blanca (EPA, 2006).

## ▪ Toxicocinética

### Absorción

La muerte y otros signos y síntomas de toxicidad en el estudio con animales de laboratorio en un corto periodo de tiempo, después de exposiciones relativamente bajas por vía oral, dérmica e inhalatoria demuestran que el metamidofos es rápidamente absorbido por estas vías (EPA, 2006)(Moffat & Osselton, 2011).

### Distribución y metabolización

No hay información registrada sobre la distribución y metabolización del metamidofos en los seres humanos. Sólo se registra un estudio que considera al O,S-dimetilhidrógeno fosforotioato (O,S-DMPT) como metabolito del metamidofos, sin embargo no hay

información al respecto que manifieste su carácter tóxico (Tomaszewska & Hebert, 2003). El metamidofos por sí mismo es un metabolito del insecticida acefato.

### **Eliminación**

El metamidofos se elimina vía urinaria principalmente (Moffat & Osselton, 2011). Tomaszewska y colaboradores plantearon a el O,S-dimetilhidrógeno fosforotioato (O,S-DMPT) como biomarcador de exposición del metamidofos en orina (Tomaszewska & Hebert, 2003).

### **▪ Toxicidad**

El metamidofos es altamente tóxico si su administración es vía oral, dérmica o respiratoria (Olson, 2004) (Krieger, 2010). Es altamente activo, sistémico y residual si se expone por alguna de las vías mencionadas, actúa inhibiendo la acción de la acetilcolinesterasa.

Por vía oral tiene un LD<sub>50</sub> en ratas de 13,0 – 15,6 mg/Kg, LD<sub>50</sub> dérmico en conejos de 118 mg/Kg y por inhalación un LC<sub>50</sub> en ratas de 0,0052 – 0,079 y de 0,062 – 0,128 mg/L. Se ha demostrado que la ingestión de metamidofos resulta en una neuropatía retardada periférica en los seres humanos (EPA, 2006). Se ha encontrado que tienen efectos negativos sobre los efectos reproductivos, un estudio reportó bajos niveles de esperma en los hombres que estuvieron expuestos a metamidofos.

Estudios teratogénicos mostraron cambios patológicos en el hígado del feto cuando se expusieron conejas preñadas a metamidofos. En cuanto a los estudios de mutagenicidad ha resultado ser positivo por genotoxicidad, o su capacidad para inducir cambios en los cromosomas en algunas pruebas y negativas en otras. Por lo cual puede ser débilmente mutagénico (Cornell University, Michigan State University, Oregon State University, n.d.)

## 2.3 Plaguicidas carbamatos

Son compuestos orgánicos derivados del ácido carbámico ( $\text{NH}_2\text{COOH}$ ). De la siguiente forma  $\text{R}_1\text{NH-CO-OR}_2$ . Donde  $\text{R}_1$  normalmente es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo y  $\text{R}_2$  puede ser un alcohol, una oxima o un fenol. Así pues los carbamatos como grupo pueden ser clasificados en N-metil carbamatos de fenoles (por ejemplo el carbofuran, carbaril y propoxur) y en N-metil carbamatos de oximas (el aldicarb y metomil).

### 2.3.1 Toxicocinética de carbamatos

#### ▪ Absorción

Son absorbidos por vía oral, respiratoria o dérmica. Si se encuentra en un ambiente laboral la ruta más probable de exposición a carbamatos es a través de la piel. La lipofilicidad de esta clase de compuestos y el hecho de que la mayoría de las formulaciones son suspensiones que contienen solventes orgánicos, facilitan la penetración dérmica rápida y la absorción hasta llegar a la circulación sistémica. Condiciones tales como la temperatura y humedad juegan un papel importante, de hecho a alta temperatura y humedad relativa se mejora la absorción; debido a que los carbamatos por lo general tienen presión de vapor baja (Krieger, 2001) .

Se absorben rápidamente por el tracto gastrointestinal, la eficiencia de esta absorción está determinada por el vehículo por el cual fue suministrado o formulado. La exposición de pequeñas cantidades de carbamatos en frutas y hortalizas está influenciado por la regulación de los carbamatos en cultivos. La absorción de grandes cantidades de carbamatos que ingresan por vía oral se asocia con intoxicaciones accidentales, con fines homicidas o suicidas (Gunnell & Eddleston, 2003) (Gunnell et al., 2007) (Dawson et al., 2010)(Krieger, 2001)

En circunstancias específicas, la inhalación puede ser una importante vía de exposición. Como se ha mencionado las presiones de vapor de algunos carbamatos hacen vulnerables su rápida volatilización cuando son aplicados en condiciones climáticas de temperatura alta de 60-70 °C(Krieger, 2001) .

## ▪ **Distribución y metabolismo**

Una vez ingresan al organismo los carbamatos se distribuyen rápidamente sobre todo a los tejidos donde son metabolizados. Debido a su característica lipofílica, son difícilmente eliminados si no son transformados a metabolitos más polares. Por lo tanto, la biotransformación está mediada por enzimas que catalizan las reacciones a compuestos más hidrofílicos. Estas enzimas catalizan principalmente las reacciones de hidrólisis y oxidación en la fase I y reacciones de conjugación en la fase II (Krieger, 2001) (Gupta, 2006).

Como los carbamatos son ésteres, durante la fase I son susceptibles a hidrólisis por carboxilesterasas inespecíficas para formar un aril alcohol más un metil o dimetil del ácido carbámico. Los ácidos carbámicos metilados inestables se descomponen rápidamente en dióxido de carbono y mono o dimetilamina. La velocidad de la hidrólisis en vivo se rige por la estructura molecular del carbamato, la especificidad o selectividad de las carboxilesterasas por el compuesto particular y las diferencias entre especies. Los carbamatos son en realidad sustratos pobres para muchas esterasas de los tejidos. En consecuencia, la hidrólisis de los diversos ésteres de carbamato es muy individualizada, sólo un porcentaje de hidrólisis ocurre con ciertos compuestos (Krieger, 2001) (Gupta, 2006) .

Por otro lado, las reacciones de oxidación y reducción que también se desarrollan en la fase I se inician por la presencia de la hemoproteína reactiva citocromo P-450, y las diversas configuraciones isoenzimáticas de los tejidos que se encuentran en todas las formas de vida. De tal manera que las isoenzimas junto con el oxígeno molecular, las flavoproteínas, el citocromo-b<sub>5</sub> y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH) desempeñan un papel importante en la destoxicación oxidativa. La naturaleza de las reacciones depende de los grupos sustituyentes del carbamato, de modo que las reacciones de oxidación que se pueden presentar son: a) oxidación de las cadenas laterales como hidroxilación de N-metil grupos o hidroxilación de sustituyentes metilo en la fracción arilo para formar grupos hidroximetilo, N-desmetilación de la amina secundaria unida al resto de arilo y b) hidroxilación de anillos aromáticos a través de la formación de un intermedio epóxido. Los tiocarbamatos pueden someterse a S-oxidación por estos mismos mecanismos oxidativos (Krieger, 2001).

En cuanto a las reacciones de fase II, las enzimas son las encargadas de conjugar el grupo introducido en la fase I (por ejemplo, OH, N=O, grupos epóxido) para obtener sustituyentes voluminosos más hidrofílicos, tales como: glucósidos, sulfatos, glucurónidos, los conjugados de aminoácidos, aminas acetiladas, o conjugados de glutatión, estos últimos son excretados como derivados del ácido mercaptúrico. En mamíferos, el sustituyente arilo que ha reaccionado se conjuga para producir sulfatos, glucurónidos, y mercapturatos. Las enzimas más importantes que participan en las reacciones de fase II incluyen transferasas de glutatión, transferasas glucuronosil, sulfotransferasas y acetil transferasas. Las reacciones efectuadas en la fase I y II aumentan en forma sustancial la solubilidad en agua de los carbamatos para finalmente eliminarse (Krieger, 2001)(Gupta, 2006).

### ▪ **Eliminación**

Los plaguicidas carbamatos se eliminan relativamente rápido por vía urinaria en forma de los compuestos biotransformados y en menor proporción por las heces. Se encuentran principalmente en orina los metabolitos glucurónidos y sulfatos derivados del sustituyente arilo. Pequeñas cantidades del carbamato sin biotransformar puede ser excretado en la orina. Mercapturatos se suelen encontrar en las heces de los mamíferos si estos no se descomponen en el tracto intestinal, luego son reabsorbidos de forma sistémica y recirculan en el organismo hasta formar otros productos que se puedan excretar en la orina (Krieger, 2001).

## **2.3.2 Aldicarb**

Es un carbamato de amplio espectro que se emplea como acaricida, insecticida o nematicida. En 1962 fue introducido por la Union Carbide Corporation con el nombre de Temik (Risher, Mink, & Stara, 1987).

La Agencia de Protección Ambiental (EPA) lo clasifica como sustancia extremadamente peligrosa. La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer IARC lo clasifica en el grupo 3, es decir; no puede ser clasificado respecto a su carcinogenicidad para el ser humano (Secretaría del Convenio de Rotterdam, 2011). La Organización mundial de la salud OMS clasifica al aldicarb en el grupo *1a* como extremadamente peligroso(Organización Mundial de la Salud OMS, 2003b).

El aldicarb se caracteriza por ser un insecticida sistémico y de contacto que se aplica al suelo durante la siembra, se absorbe por el sistema radicular y se traslada por toda la planta. De modo que controla los nematodos por contacto e ingestión en el suelo y en la parte aérea cuando un insecto, masticador o chupador lo ingiere al alimentarse, muere. Específicamente es altamente tóxico para lombriz de tierra junto con el carbofuran y el carbaril (Risher et al., 1987).

Es eficaz contra los tisanópteros, arañas rojas, lygus, chinches y minadores de las hojas en una variedad de cultivos como: frutas (bananos, uvas, fresas, cítricos), vegetales (tomates, zanahorias, repollos, papas, cereales, maíz, café, remolacha, guisantes forrajeros y caña de azúcar), ornamentales y perennes, viveros y flores (rosas, claveles, crisantemos) (Risher et al., 1987)(EPA, 2007)

El conocimiento tanto de las propiedades físico-químicas del aldicarb como su toxicocinética, permite el entendimiento de sus características toxicológicas y el impacto sobre la salud de este plaguicida.

### ▪ **Propiedades Físico-Químicas**

El aldicarb pertenece a la familia química de N-metil carbamato, ya que como derivado del ácido carbámico R1 es un grupo metilo y R2 es una oxima. Se presenta como cristales incoloros, con un olor sulfuroso leve. Es un compuesto estable, a excepción de soluciones alcalinas fuertes, no es inflamable ni corrosivo (Figura 2-4). El Aldicarb y sus metabolitos son térmicamente lábiles y relativamente polares.

**Punto de fusión:** 99 – 100 °C.

**Presión de vapor:**  $9,75 \times 10^{-5}$  mm Hg.

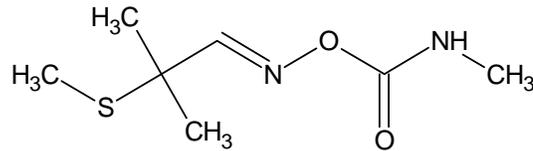
**Densidad/ Gravedad específica:** 1,2 a 25 °C.

**Solubilidad:** En agua pH 7: 4,93 g/L a 20°C, en acetona 350 g/Kg a 25°C, en diclorometano 300 g/Kg a 25°C, benceno 150 g/Kg a 25°C, xileno 150 g/Kg a 25°C y muchos solventes orgánicos.

**Fórmula molecular:**  $C_7H_{14}N_2O_2S$ .

**Peso molecular:** 190,27 g/mol.

**Nombre IUPAC:** (EZ)-2-metil-2-(metiltio)propionaldehido O-metilcarbamoiloxima (Krieger, 2010)

**Figura 2-4:** Estructura química del aldicarb.

## ▪ Toxicocinética

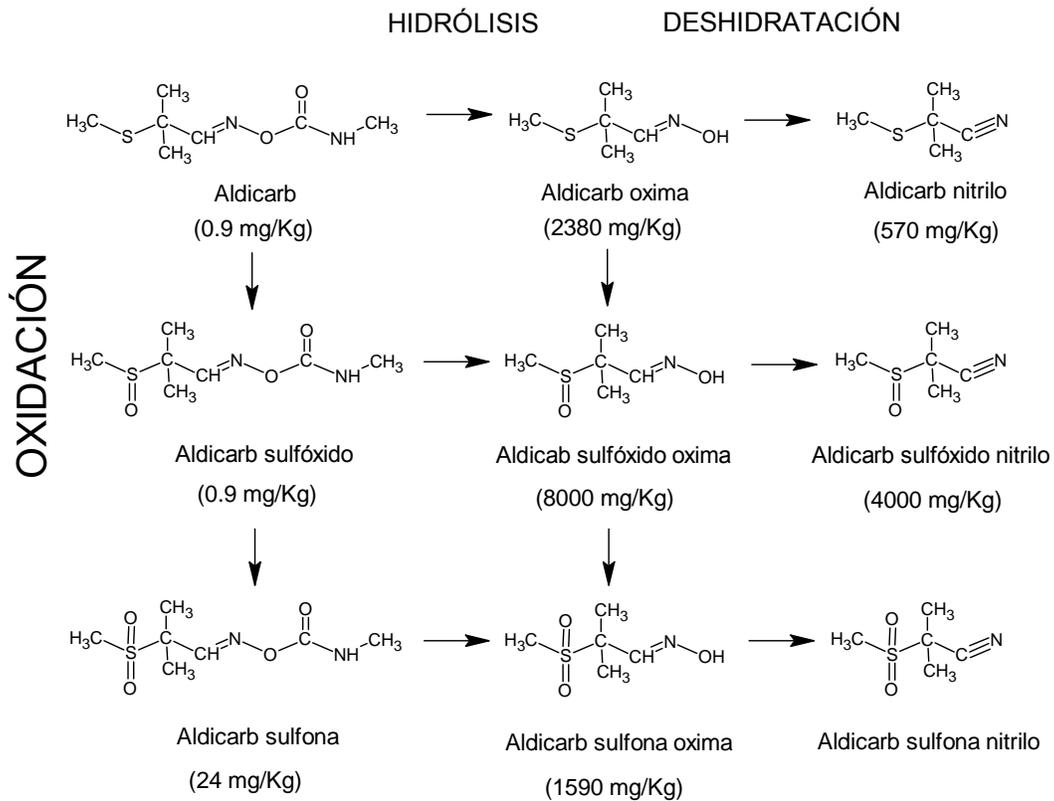
### Absorción

El aldicarb puede ingresar al organismo humano por cualquiera de las tres vías de exposición: oral, dérmica o por inhalación. El aldicarb y sus metabolitos activos (aldicarb sulfóxido y sulfona) se absorben eficientemente por el tracto gastrointestinal y en menor medida a través de la piel. La absorción rápida y casi completa del aldicarb después de dosis orales, ha sido documentada en varios estudios (Risher et al., 1987)(Proença et al., 2004)(Parilla Vázquez, Martínez Vidal, & Martínez Fernández, 2000)(Mart, Vázquez, & Mart, 2000)(Lacassie, Marquet, Gaulier, Dreyfuss, & Lachâtre, 2001).

### Distribución y metabolización

Se distribuye a todos los tejidos y atraviesa con dificultad la barrera hematoencefálica. Sin embargo, como es metabolizado de forma rápida esta invasión a los tejidos se considera temporal.

El metabolismo del aldicarb se realiza a nivel hepático e involucra tanto la hidrólisis del grupo éster del carbamato como la oxidación del azufre a sulfóxido y sulfona. Mientras que los productos de biotransformación de la hidrólisis, son compuestos con poco o ninguna actividad insecticida o tóxicos para los organismos; el aldicarb sulfóxido y aldicarb sulfona son ambos metabolitos tóxicos, puesto que son biológicamente activos al inhibir la actividad de la acetilcolinesterasa (Figura 2-5). Ambos productos de biotransformación pueden ser destoxificados por hidrólisis a oximas y nitrilos (Risher et al., 1987) (Baselt, 2004).

**Figura 2-5:** Metabolismo del Aldicarb. Modificada de (Risher et al., 1987)(INCHEM, n.d.).

### Eliminación

El Aldicarb y sus metabolitos son excretados por vía urinaria y una pequeña porción vía biliar (Mart et al., 2000). Estudios en animales han indicado que al menos el 90% de la dosis oral se elimina por la orina, en su mayoría como metabolitos dentro de un periodo de 10 días (Baselt, 2004). De un 2% al 5% es eliminado en heces dentro de las primeras 24 horas después de la administración de Aldicarb en ratas. Su vida media es de 6 a 20 horas. El Aldicarb no se acumula en el organismo durante largos periodos de exposición. (Moffat & Osselton, 2011). De acuerdo a otro estudio en ratas, la eliminación durante el primer día es aproximadamente del 40% para el Aldicarb sulfóxido, el 30% para la oxima sulfóxido y el restante 30% entre los otros 5 a 9 compuestos polares (Risher et al., 1987).

## ▪ Toxicidad

El aldicarb puede causar intoxicaciones accidentales fatales debido a su mal uso, ya sea por su ingestión, inhalación o cuando es absorbido a través de la piel. A dosis muy altas pueden generar parálisis tanto del sistema respiratorio como del sistema nervioso. El efecto tóxico puede presentarse entre los 15 minutos y 3 horas de la exposición, pero pueden desaparecer absolutamente entre 4-12 horas. (Moffat & Osselton, 2011).

Por vía oral tiene un LD<sub>50</sub> en ratas de 1 mg/Kg aproximadamente, LD<sub>50</sub> dérmico en conejos de 5 mg/Kg y por inhalación un LC<sub>50</sub> en ratas de 0,0039 mg/L. Por otro lado, el aldicarb sulfóxido muestra una toxicidad comparable con el aldicarb cuando es absorbido por vía oral con un LD<sub>50</sub> de 0,9 mg/kg en ratas, mientras que el aldicarb sulfona al presentar un valor de LD<sub>50</sub> de 25 mg/kg en ratas, es mucho menos tóxico (Krieger, 2010).

El aldicarb tiene una toxicidad aguda alta, causando síntomas colinérgicos debido a la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) como mecanismo de acción. Estos síntomas son dosis dependientes y rápidamente reversibles y no ocurre en los niveles de exposición humana esperados, el aldicarb tampoco es genotóxico ni carcinogénico. Sus productos de biotransformación el aldicarb sulfóxido y el aldicarb sulfona también son potentes inhibidores de la acetilcolinesterasa (Krieger, 2010).

### 2.3.3 Carbofurano

El carbofurano o carburan es un compuesto orgánico que se compone de un benzofuranil unido a un grupo carbamato (derivado del ácido carbámico). Es un N-metilcarbamato de fenol de amplio espectro utilizado como insecticida, acaricida y nematicida. El carbofurano fue desarrollado en los 1960s y patentado en 1965, fue introducido en el mercado como un nematicida sistémico y de amplio espectro en 1967 bajo el nombre comercial conocido de Furadan por FMC (Farm Machinery Corporation) en Filadelfia - Estados Unidos (Richards, 2012). Ha sido empleado comercialmente desde entonces como plaguicida en la agricultura en la forma de polvo humectable en un 75% y en gránulos de 2 a 10%. El carbofurano es un inhibidor reversible de la colinesterasa (Baselt, 2004).

De acuerdo a la clasificación de toxicidad, la EPA lo cataloga en la categoría I como sustancia altamente tóxica para toxicidad aguda por vía oral y respiratoria de acuerdo a los estudios hechos en ratas; y en la categoría III como ligeramente tóxico para toxicidad aguda por vía dérmica de acuerdo a los estudios hechos en conejos (United States Environmental Protection Agency EPA, 2007). La Organización mundial de la salud OMS clasifica al carbofurano en el grupo *Ib* como altamente peligroso (Moffat & Osselton, 2011).

El carbofurano se utiliza contra las plagas del suelo y foliares de campo, frutas, vegetales y cultivos forestales. Específicamente en los siguientes cultivos alimenticios de: La alfalfa, alcachofa, plátano, cebada, café, maíz, algodón, pepino, melón, calabaza, uvas, avena, chile, plátano, papa, sorgo, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol y trigo. En los cultivos de algodón, ornamentales y árboles de sombra, plantas ornamentales herbáceas, plantas sin flores ornamentales, arbustos ornamentales leñosos y viñas, pinos, espinaca cultivada para semilla y tabaco (United States Environmental Protection Agency EPA, 2007)(Greene & Pohanish, 2005).

Las plagas que son objetivo del carbofurano son: gorgojo de la alfalfa, áfidos, barrenador de la raíz del banano, escarabajo de la papa de Colorado, gusano de la papa, gusano de raíz del maíz, escarabajos del pepino, barrenador europeo del maíz, escarabajos, pulgas, saltamontes, chicharritas, nematodos, barrenador del maíz y gusano de alambre (United States Environmental Protection Agency EPA, 2007).

### ▪ **Propiedades Físico-Químicas**

Carbofurano es un sólido blanco y cristalino inodoro, estable en condiciones neutras y ácidas, pero se descompone bajo condiciones alcalinas.

**Punto de fusión:** 150-152 °C.

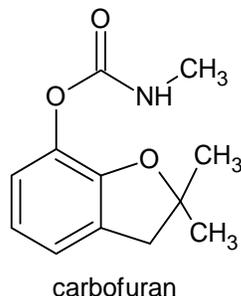
**Presión de vapor:**  $6 \times 10^{-6}$  mmHg a 20°C;  $1,8 \times 10^{-5}$  mmHg a 30°C y  $2,7 \times 10^{-3}$  Pa a 33°C.

**Solubilidad:** Es ligeramente soluble en agua y muy soluble en N-metil-2-pirrolidona, dimetilformamida, sulfóxido de dimetilo, acetona, acetonitrilo, diclorometano, ciclohexanona, benceno y xileno.

**Fórmula molecular:**  $C_{12}H_{15}NO_3 = 221,29$  g/mol

**Nombre IUPAC:** 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofurano-7-metilcarbamato.

**Figura 2-6:** Estructura química del carbofuran.



## ▪ Toxicocinética

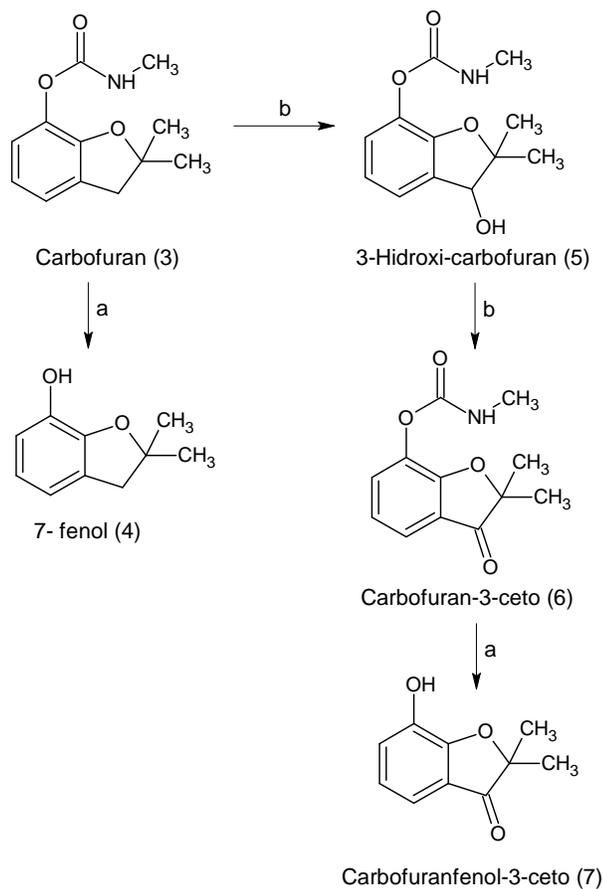
### Absorción

Se absorbe por vía digestiva, respiratoria y cutánea. La ingesta de carbofurano es rápidamente absorbida y en cantidades altas se ha asociado con intoxicaciones accidentales, homicidios y suicidios (Tennakoon, Karunarathna, & Udugampala, 2012)(Ameno et al., 2001). Como se mencionó en la absorción de los carbamatos, la exposición por vía inhalatoria está asociado a ambientes laborales.

### Distribución y metabolización

Después de la absorción del carbofurano se distribuye rápidamente y no se acumulan en el organismo. Su biotransformación se realiza a través de tres mecanismos básicos: Hidrólisis, oxidación y conjugación. Los estudios realizados en ratones, ratas, vacas lecheras y estudios microsomales de hígado humano han demostrado claramente que el carbofurano se metaboliza principalmente a 3-hidroxi-carbofurán, el cual se oxida lentamente por acción del CYP a 3-cetocarbofuran. Este 3-cetocarbofuran no es estable y por lo tanto es inmediatamente hidrolizado de forma no enzimática a 3-ceto-carbofuran-fenol. La N-metil-hidroxilación es una vía metabólica menor del carbofurano y la hidroxilación del anillo aromático no se encuentra en mamíferos (Figura 2-7). Los metabolitos 3-hidroxi-carbofurán y 3-cetocarbofuran son bioactivos puesto que conserva el grupo carbamato que inhibe la acción de la AChE (Baselt, 2004)(Stenersen, 2004)(Gupta, 2006)(Krieger, 2010)(Tennakoon et al., 2012).

**Figura 2-7:** Metabolismo del carbofuran en mamíferos. Tomado de (Petropoulou, Gikas, Tsarbopoulos, & Siskos, 2006).



(a) Proceso de hidrólisis (b) Proceso de oxidación enzimática por la P450. Los metabolitos 7-fenol (4), 3-hidroxi-carbofurán (5) y 3-ceto-carbofuran-fenol (7) son principalmente eliminados vía urinaria con 20%, 14% y 48%, respectivamente. El 3-cetocarbofuran (6) es excretado en orina menor al 1,1% (Petropoulou et al., 2006)

### Eliminación

La eliminación del carbofurano es principalmente vía urinaria (Mart et al., 2000)(Parilla Vázquez et al., 2000)(Cazorla-Reyes, Fernández-Moreno, Romero-González, Frenich, & Vidal, 2011). En un estudio de exposición de trabajadores, un promedio del 7% de la dosis absorbida por exposición dérmica y respiratoria se eliminó como carbofurano dentro de los primeros cuatro días de exposición. El 65% de la dosis suministrada a ratas fue eliminada en orina dentro de 48 horas como metabolitos glucorónidos conjugados de los productos de oxidación (Baselt, 2004).

## ▪ Toxicidad

El carbofurano tiene una toxicidad alta en el ser humano desde el momento de su exposición (Olson, 2004) con un LD<sub>50</sub> por vía oral de 6,0 – 7,8 mg/Kg en ratas, una LD<sub>50</sub> dérmica de 4.403 (2.900 – 6.685) mg/Kg en conejos y por inhalación un LC<sub>50</sub> de 0,08 mg/L en ratas. Lo cual hace la ruta oral mucho más tóxica cuando es ingerido que cuando se expone por vía dérmica (United States Environmental Protection Agency EPA, 2007).

El efecto de la exposición al carbofuran es la inhibición de la colinesterasa que causa los síntomas de intoxicación y hasta la muerte si no se recupera la acción de la colinesterasa. La mayoría de los estudios realizados con carbofurano han sido negativos para teratogenicidad. Sin embargo, un estudio realizado en ratones dio lugar a anomalías estructurales definidas y el efecto en la reproducción registró una disminución de peso en los ratones adultos, así mismo en los recién nacidos un empeoramiento del 15% en peso cuando son destetados. Efectos testiculares y espermatotóxicos también se observaron a niveles mayores de 0,2 mg/Kg en ratas expuestas a carbofurano en el útero o través de la lactancia. Estudios realizados en ratas han concluido que carbofurano administrado por vía oral a concentraciones de 0,2, 0,4 y 0,8 mg/Kg durante la gestación temprana es perjudicial para el embarazo y posiblemente perjudicial para el desarrollo neonatal (Krieger, 2010).

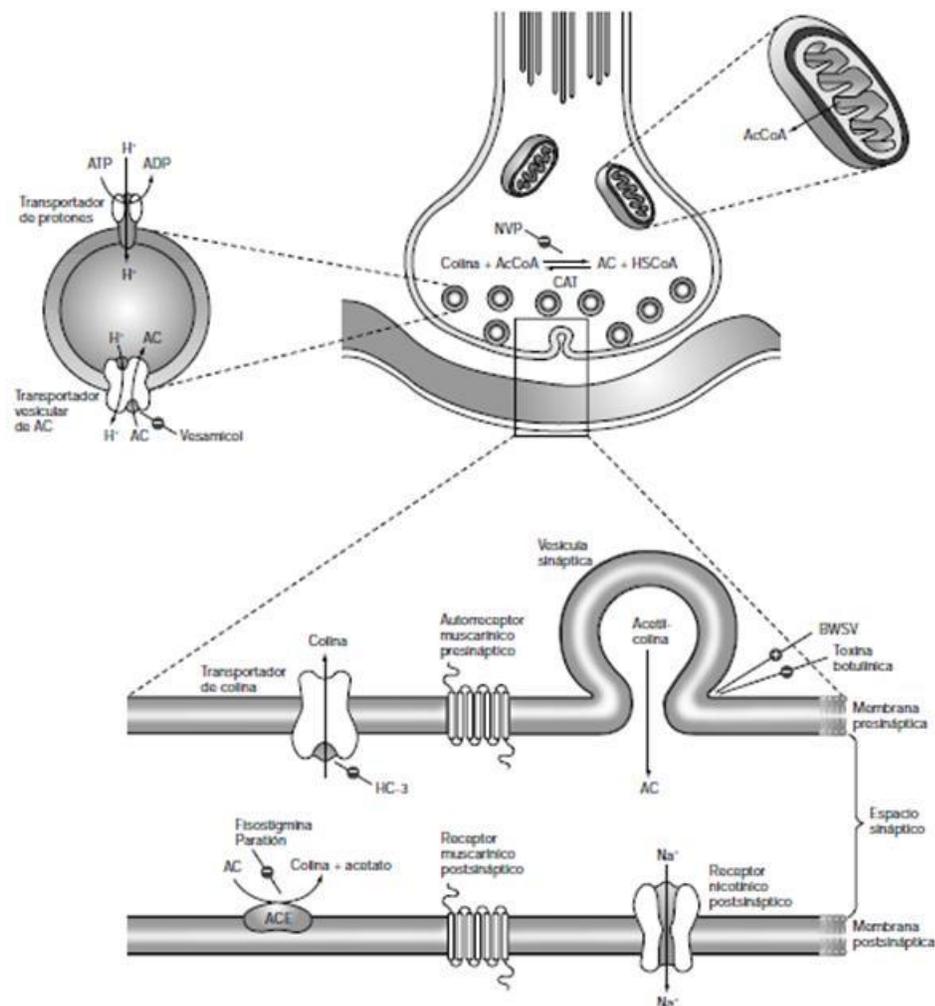
Sobre el efecto en el sistema inmune, conejos alimentados con dosis de carbofuran mostraron reducción en el número de linfocitos activados en los ganglios linfáticos, disminuyó el número de centros germinales esplénicos y atrofia de la corteza tímica (Gupta, 2006).

## 2.4 Toxicodinamia de plaguicidas organofosforados y carbamatos

### 2.4.1 Sinapsis colinérgica

Es el proceso neuroquímico en el cual la excitación se realiza por medio de moléculas de acetilcolina (AC) (Figura 2-8). La acetilcolina como neurotransmisor participa en forma dinámica en el impulso nervioso. Es sintetizada en el citoplasma neuronal a partir de la colina y de la acetilcoenzima A (acetil-CoA, "acetato activado") mediante la acción de la enzima colinoacetiltransferasa.

**Figura 2-8:** Sinapsis colinérgica donde se aprecia la participación de la acetilcolina. Tomado de (Flórez, 1997).



Los fenómenos de transmisión en la sinapsis colinérgica empieza con la llegada del potencial de acción al extremo de la neurona presináptica que estimula la entrada de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana presináptica, como respuesta a la apertura de los canales de calcio dependientes del potencial. Esta acción genera la fusión de las vesículas presinápticas que contienen la acetilcolina con la membrana presináptica y se liberan las moléculas de acetilcolina por exocitosis en el espacio sináptico.

Una vez en el espacio sináptico la acetilcolina se une a una proteína receptora específica de la membrana postsináptica, lo cual estimula la apertura del conducto transmembránico en el complejo receptor y permite el ingreso de iones  $\text{Na}^+$  y la salida de iones  $\text{K}^+$ . Este movimiento iónico químicamente regulado, es la base de la despolarización local de la membrana postsináptica, que transmite el potencial de acción a la neurona postsináptica. Este potencial es graduado, es decir; a mayor acetilcolina liberada en la membrana presináptica mayor es la despolarización. El conducto transmembránico de iones se cierra una vez ocurre la disociación de la acetilcolina con su neuroreceptor específico, lo que impide que la despolarización sea permanente.

El neurotransmisor acetilcolina libre es metabolizado en el espacio sináptico en un proceso hidrolítico catalizado por la enzima acetilcolinesterasa a dos productos: acetato y colina. La colina es transportada de vuelta a la neurona presináptica donde la enzima colinoacetiltransferasa cataliza la resíntesis de la acetilcolina. El paso donde la colina es reabsorbida por endocitosis a través de la membrana presináptica es fundamental, ya que las neuronas no la pueden sintetizar. El proceso global es muy rápido y puede tardar alrededor de un milisegundo.

Las sinapsis colinérgicas son propias de:

- Los sitios efectores autónomos inervados por fibras parasimpáticas posganglionares.
- La médula suprarrenal y las células ganglionares simpáticas y parasimpáticas inervadas por fibras autónomas preganglionares.
- Terminales motoras del músculo esquelético inervadas por nervios motores somáticos.
- Algunas sinapsis dentro del sistema nervioso central.

Existen dos tipos de sinapsis colinérgicas: las muscarínicas y las nicotínicas, que se diferencian por el tipo de receptor, su localización y la función fisiológica que cumple. Los efectos de los alcaloides muscarina y nicotina sobre las uniones colinérgicas le dieron el nombre y caracterización de los receptores. Cuando el efecto de un compuesto al unirse a un receptor es el mismo que produce la acetilcolina en las células efectoras autónomas se denomina efectos muscarínicos. Por otro lado, la estimulación y el bloqueo posterior de ganglios autónomos y placas terminales del músculo esquelético por parte de la acetilcolina u otros compuestos se llaman efectos nicotínicos. La d-tubocurarina bloquea en forma eficaz la sinapsis nicotínica y la atropina bloquea selectivamente la sinapsis muscarínicas.

Las enzimas hidrolíticas carboxilesterasas y colinesterasas, se conocen como las serinas esterases debido a que su sitio de acción catalítico contiene un residuo de serina nucleofílica que participa en la hidrólisis de diversos substratos xenobióticos.

La acetilcolinesterasa (AChE) es un enzima serina esterasa cuya función consiste en el cese de la acción de la acetilcolina (ACh), con la posterior interrupción del impulso nervioso. En los vertebrados las enzimas que hidrolizan la acetilcolina denominadas colinesterasas pueden ser de dos tipos:

- Acetilcolinesterasa (AChE), colinesterasa verdadera, colinesterasa eritrocitaria, específica, o de tipo e, está presente en las neuronas, en la unión neuromuscular y en otros tejidos.
- Butirilcolinesterasa (BuChE), pseudocolinesterasa, colinesterasa plasmática, colinesterasa inespecífica de tipo s, se encuentra en el plasma, el hígado y otros órganos, en diferentes tipos de células gliales y en un grado restringido en el sistema nervioso central y periférico.

Ambas enzimas colinesterasas son capaces de hidrolizar la acetilcolina y algunos ésteres aromáticos y alifáticos, además pueden ser inhibidas por la fisostigmina. Pero su principal diferencia y de interés a nivel toxicológico, radica en que los compuestos organofosforados y carbamatos son capaces de inhibir la acetilcolinesterasa y por consiguiente la acumulación de la acetilcolina en el espacio sináptico produce

esencialmente todos los efectos farmacológicos, mientras que la inhibición de la butirilcolinesterasa no manifiesta perturbación funcional. (Flórez, 1997)

## 2.4.2 Mecanismo de acción

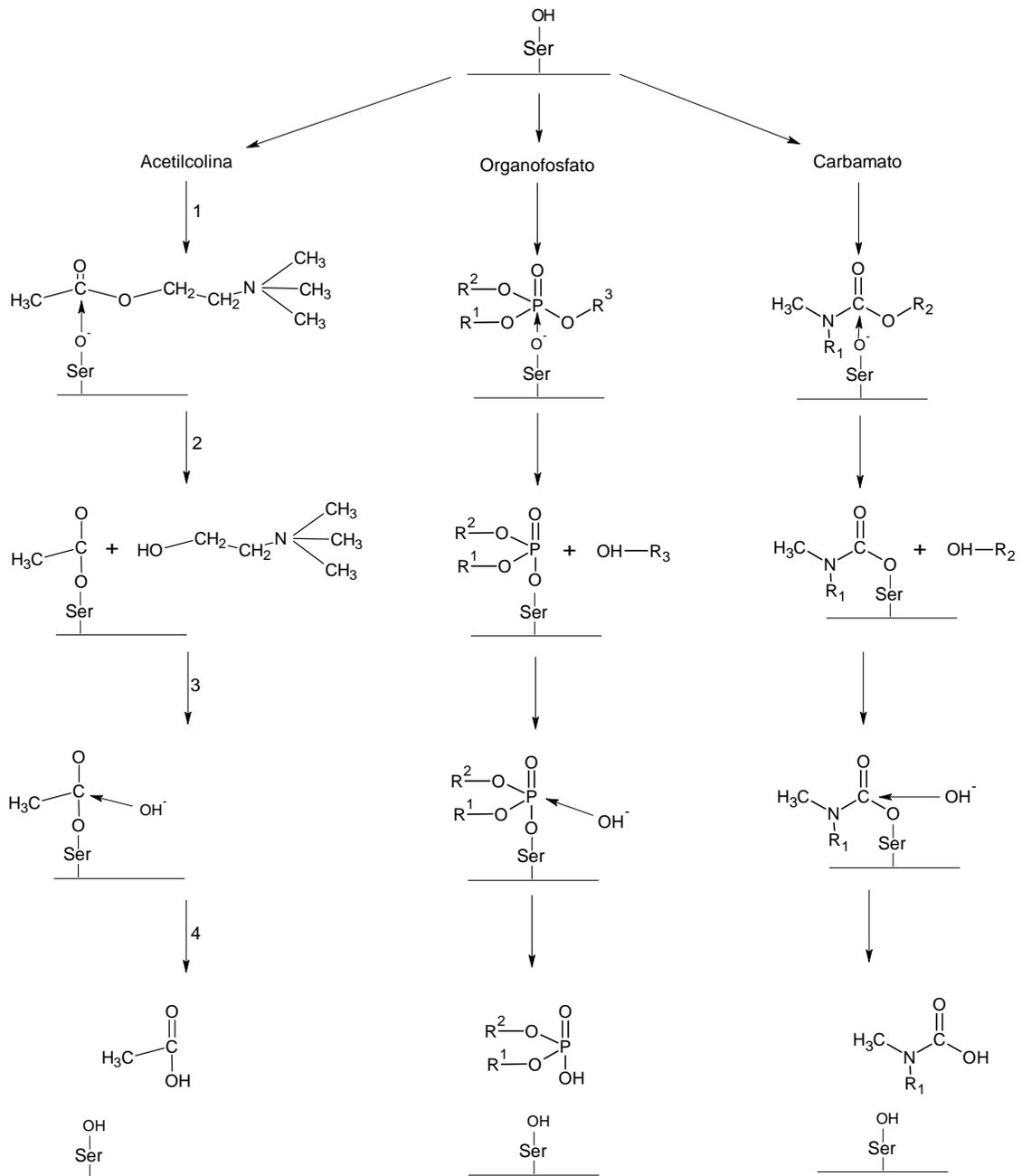
Si bien los organofosforados y carbamatos tienen estructuras químicas diferentes como se ha descrito, el mecanismo de acción sobre el organismo a través del cual causa toxicidad es similar y consiste en la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en la sinapsis colinérgica. En efecto, la ACh liberada en las terminaciones nerviosas colinérgicas se elimina únicamente a través de la hidrólisis por la AChE, mediante un proceso continuo de acetilación de la enzima con separación de la colina y separación del grupo acetilo. Los inhibidores de la AChE intervienen en el proceso al reaccionar con la enzima e inactivarla, que provoca la acumulación de la ACh en la sinapsis colinérgica y la sobre estimulación de los receptores colinérgicos de tipo muscarínico y nicotínico.

La clave del mecanismo de reacción radica en el grupo hidroxilo de la serina de la enzima como sitio activo de la proteína. En condiciones normales, este grupo hidroxilo ataca el substrato acetilcolina en el carbono carboxilo que resulta en un enlace covalente entre la enzima y el substrato. Después de la liberación de la fracción de colina, la enzima permanece transitoriamente acetilada. Luego, en un corto tiempo (en el rango de milisegundos), la enzima acetilada es hidrolizada por ataque nucleofílico del ion hidroxilo y finalmente el grupo hidroxilo de la serina (el sitio activo de la enzima) es regenerado.

Los organofosforados inhiben la colinesterasa por formación de un enlace químico covalente con la acetilcolinesterasa a través del proceso de fosforilación, este comportamiento explica en gran medida la irreversibilidad del proceso de fosforilación con la mayoría de los fosforados (Figura 2-9).

La intoxicación aguda por un organofosforado resulta en la inhibición de la acetilcolinesterasa, aunque no es el único mecanismo se considera que es el fundamental de los procesos fisiopatológicos.

**Figura 2-9:** Interacción de la acetilcolina, organofosforados y carbamatos con el sitio activo de la serina de la colinesterasa. Modificada (De Bleecker, 2008)



El paso 1 muestra la formación del complejo estable Michaelis y el inicio del ataque nucleofílico sobre el sitio activo de la serina de la AChE. El paso 2 es la acetilación de esta serina y la liberación del grupo saliente. El paso 3 representa el ataque nucleofílico de un ion hidroxilo y por último el paso 4 representa la regeneración de la enzima activa.

En presencia de organofosforados el grupo hidroxilo de la serina de la enzima es atacado por el fósforo altamente electrofílico en el centro de la molécula del organofosforado en lugar del substrato fisiológico ACh. La primera reacción es la formación del complejo de Michaelis, mientras que la subsiguiente reacción conduce a la fosforilación de la AChE. Esto se acompaña con la pérdida del grupo saliente del organofosforado y la formación del enlace covalente entre el organofosforado y la enzima. Este enlace entre el átomo de fósforo y el sitio esteárico de la enzima es más estable que el enlace entre el carbono carbonilo del acetato (en la reacción con la ACh) y el mismo sitio de la enzima, por lo tanto; la enzima modificada no es fácilmente hidrolizada. En efecto, el nuevo éster fosfato formado es lentamente metabolizado (en días o semanas) y la enzima permanece en la forma inactiva. La reactivación espontánea depende de la naturaleza química de los sustituyentes R. La reactivación decrece desde un sustituyente dimetoxi > dietoxi > diisopropoxi (Figura 2-9) (De Bleecker, 2008).

Mientras el agua es un grupo nucleofílico débil, los derivados de las hidroxilaminas conocidas como oximas facilitan la desfosforilación de la AChE y son utilizadas en el tratamiento de la intoxicación por organofosforados. En el caso que la AChE fosforilada envejezca, no se da a lugar la reactivación de la enzima. Se llama envejecimiento cuando se pierde uno de los grupos sustituyentes R alquil por hidrólisis no enzimática. En este sentido, se considera como la inhibición irreversible de la AChE, cuando la AChE fosforilada ha envejecido y su actividad sólo puede ser reemplazada por la síntesis de una nueva enzima, proceso tal que podría tomar días.

Por su parte el mecanismo de acción por el cual los carbamatos inhiben la AChE consiste en el ataque nucleofílico del oxígeno activo de la serina al carbono electrofílico del carbonilo. El compuesto intermedio que es la enzima carbamilada inhibe la acción de la AChE. Si la molécula de agua ataca al carbono del grupo carbonilo reacciona para reactivar la enzima y producir el ácido carbámico. La velocidad de reactivación es considerablemente mayor que la de AChE fosforilada, pero menor a la reactivación del intermedio acetilado que se forma normalmente con la ACh (Figura 2-9).

Los carbamatos también son inhibidores de la BuChE, el grado de la inhibición varía dependiendo del compuesto específico, pero generalmente es modesta después de una exposición moderada.

La diferencia entre la inhibición de la AChE por parte de los organofosforados y carbamatos se encuentra en la velocidad en que la desfosforilación o descarbamilación de la enzima que se lleva a cabo respectivamente. Por lo tanto, como la velocidad de desfosforilación es extremadamente lenta, frecuentemente se designa a los organofosforados como inhibidores irreversibles y debido a que la velocidad de descarbamilación es suficientemente rápida, se considera que son inhibidores reversibles. Adicionalmente, la AChE carbamylada no se somete a la reacción de envejecimiento (De Bleeker, 2008).

### **2.4.3 Reactivación por oximas de las colinesterasas inhibidas**

Estudios del mecanismo de acción de los inhibidores de las colinesterasas han encontrado que compuestos más nucleofílicos que el agua realizan una mejor reactivación de la enzima AChE fosforilada. Este es el caso de compuestos con un grupo amonio cuaternario y un nucleófilo ácido pueden reaccionar con la enzima fosforilada. De este modo, se han sintetizado diversas oximas como reactivadores para el tratamiento de las intoxicaciones (De Bleeker, 2008).

La función de los reactivadores consiste en acelerar la reactivación de AChE fosforilada mediante el ataque nucleofílico de la oxima sobre el fósforo de la enzima fosforilada para obtener la oxima fosforilada y liberar la enzima. Esta reacción es favorecida porque los ésteres organofosforados tienen buenos grupos salientes. La reactivación por parte de la oxima sólo se puede producir si el proceso de envejecimiento no ha ocurrido. Sin embargo, esta oxima fosforilada puede volver a inhibir la AChE si la reacción es estable en un medio acuoso, reduciendo así su eficacia para el tratamiento de intoxicación con organofosforados. Un ejemplo es la pralidoxima (2-PAM) que sirve para la reactivación. Esto explica la acción anticolinesterásica menos intensa y más reversible de los carbamatos que la de los organofosforados.

## **2.5 Efectos adversos a la salud de los plaguicidas organofosforados y carbamatos**

Al no degradarse la ACh por la inhibición de la AChE se produce una hiperactividad colinérgica que finaliza con la muerte del individuo, los efectos de acuerdo a los receptores afectados se encuentran en la tabla 2-2. Los organofosforados también inhiben otras esterasas que no producen signos de trascendencia clínica por lo menos en una intoxicación aguda (Repetto, 1995).

En el momento de la evaluación de una intoxicación por plaguicidas inhibidores de colinesterasas ya sean carbamatos u organofosforados, el comienzo de los signos y síntomas depende del grado de inhibición de la AChE y de alguna forma, de la rapidez de este proceso. Así, mismo estos signos y síntomas pueden variar de frecuencia e intensidad según el grado de intoxicación. En la patología por plaguicidas organofosforados se puede distinguir las siguientes manifestaciones de intoxicación: Intoxicación aguda o crisis colinérgica, síndrome intermedio (IMS) y neuropatía retardada. En la intoxicación por carbamatos sólo se presenta crisis colinérgica, puesto que son rápidamente metabolizados. En este contexto, en la tabla 2-2 y 2-3 se expone las manifestaciones de la intoxicación por inhibidores de colinesterasa, entendiéndose entonces, que sólo los signos y síntomas de la intoxicación aguda son comunes a los organofosforados y carbamatos (Repetto, 1995).

Las manifestaciones clínicas de la crisis colinérgica responden a la atropina, mientras que el síndrome intermedio y la neurotoxicidad retardada no pueden controlarse con atropina.

Cuando la actividad de la AChE desciende en un 50% en el individuo, por cuyo motivo permanece en la sinapsis sin hidrolizar, el neurotransmisor acetilcolina produce diversos signos y síntomas entre los que se encuentra la hiperexcitación del sistema nervioso central (SNC). De acuerdo a los receptores muscarínicos o nicotínicos donde actúe el organofosforado o carbamato y los efectos sobre el SNC, la intoxicación aguda de base colinérgica produce un triple cuadro por: síndrome muscarínico parasimpaticomimético, nicotínico y neurológico.

**Tabla 2-2:** Signos y síntomas según los receptores afectados y el sistema nervioso central (Peña, Perez, & Mahecha, 1990)(De Bleecker, 2008).

| <b>Síndrome muscarínico, parasimpaticomimético</b>  |   |
|---|---|
| Estimulación parasimpática postganglionar, receptores muscarínicos especialmente en el músculo liso, corazón y glándulas exocrinas. |   |
| <b>Pulmón - Bronquios</b>   | Respiración difícil por broncoconstricción, sibilancias, disnea, broncorrea, tos, edema pulmonar, cianosis. |
| <b>Sistema gastrointestinal</b>   | Náuseas, emesis, opresión y espasmos abdominales, diarrea, incontinencia fecal, cólicos y tenesmo.          |
| <b>Sistema cardiovascular</b>   | Bradicardia, hipotensión, arritmias, fibrilación ventricular y asistolia.                                   |
| <b>Glándulas exocrinas</b>  | Aumento de la sudoración, salivación y lagrimeo.  |
| <b>Sistema Urinario</b>   | Disuria, incontinencia urinaria.  |
| <b>Ojos</b>   | Miosis, visión borrosa, cefalea, epifora hiperemia conjuntival.   |
| <b>Membranas mucosas</b>  | Hiperemia rinorrea.   |

| <b>Síndrome nicotínico</b>                |   |
|---|---|
| Estimulación de la unión neuromuscular    |   |
| <b>Músculo esquelético (Placa motora)</b> | Contracciones musculares, fasciculaciones, calambres, debilidad, insuficiencia respiratoria y mialgias. Conduce a parálisis de miembros y músculos respiratorios. |
| <b>Sinapsis ganglionares</b>              | Cefalea, hipertensión pasajera, mareo, palidez y taquicardia.   |

| <b>Sistema Nervioso Central</b> |   |
|---------------------------------|---|
| Síndrome neurológico            |   |
| <b>Sistema nervioso central</b> | Mareo, ansiedad, agitación, labilidad emocional, sueño excesivo, insomnio, temblor, apatía, depresión, somnolencia, confusión, ataxia, coma con arreflexia, respiración de Cheyne-Stokes, convulsiones, depresión de los centros respiratorios y circulatorios. |

Las intoxicaciones por carbamatos produce síntomas colinérgicos causados por la inhibición de la AChE; en estos casos las vías principales de absorción son la respiratoria

y la dérmica. Los síntomas de la intoxicación aparecen pocos minutos después de la exposición y puede durar varias horas. (García & Repetto, 2008).

**Tabla 2-3:** Intoxicación por organofosforados (OP) y carbamatos (CM).

| <b>Intoxicación Aguda o crisis colinérgica (Organofosforados y carbamatos)</b>   | <b>Neurotoxicidad intermedia (IMS) (OPs Neurotóxicos)</b>   | <b>Neurotoxicidad retardada (Organofosforados neurotóxicos)</b>  |
|--|---|--|
| <p><b>Inicio:</b> Una sobredosis aguda de OP o CM causa una rápida inhibición de la AChE, pero depende de la vía de absorción, cantidad y tipo de producto.</p> <p><b>Leve:</b> Las manifestaciones clínicas son debilidad, intranquilidad, mareo, cefalea, visión borrosa, epifora, miosis, sialorrea, náuseas, emesis, pérdida del apetito, dolor abdominal, espasmo bronquial moderado.</p> <p><b>Moderada:</b> Se expresa con debilidad generalizada de aparición súbita, sudoración, cefalea, miosis, nistagmus, visión borrosa, contractura de músculos faciales, temblor en manos y otras del cuerpo, fasciculaciones, excitación, trastornos en la marcha y sensación de dificultad respiratoria, broncorrea, broncoconstricción, estertores crepitantes, cianosis, bradicardia, sialorrea, dolor abdominal y diarrea.</p> <p><b>Severa:</b> caracterizada por temblor súbito, convulsiones tonicoclónicas generalizadas, intensa cianosis de las mucosas, hipersecreción bronquial, incontinencia de esfínteres, midriasis (si el intoxicado está hipóxico), edema pulmonar no cardiogénico, coma, muerte por falla cardíaca o respiratoria.</p> <p><b>Pronóstico:</b> La recuperación depende del grado de intoxicación y del manejo del paciente. Si es por un organofosforado la intoxicación, dependiendo de cuál sea puede aparecer efectos tardíos.</p> | <p><b>Inicio:</b> De forma súbita de 24 a 96 horas después de la intoxicación aguda.</p> <p>Se presenta debilidad parálisis de nervios craneales. Debilidad de músculos proximales de extremidades y flexores del cuello. Debilidad y parálisis de músculos respiratorios.</p> <p><b>Pronóstico:</b> Recuperación de 5 a 20 días, si el manejo es adecuado por lo general no quedan secuelas.</p> | <p><b>Inicio:</b> De 1 a 3 semanas después de la exposición con o sin cuadro previo de intoxicación aguda.</p> <p>Se presentan calambres, sensación de quemadura y dolor sordo o punzante simétrico en pantorrillas y menos frecuente en tobillos y pies; parestesias en pies y piernas. Luego, debilidad de músculos peroneos, con caída del pie, seguida de disminución de sensibilidad al tacto, al dolor y a la temperatura en extremidades inferiores y en menor grado, en extremidades superiores y atrofia muscular.</p> <p>Signo de Romberg, pérdida de reflejos aquilianos y de contractura de tobillo. Por último, se instala parálisis que afecta miembros inferiores, pero también puede alcanzar los superiores.</p> <p><b>Pronóstico:</b> Después de un adecuado tratamiento de sostén, la recuperación se puede presentar entre 6 a 18 meses, después del inicio del déficit neurológico. En casos severos puede quedar algún tipo de secuelas.</p> |

### **2.5.1 Síndrome intermedio (IMS)**

Después del síndrome colinérgico, una segunda manifestación de la intoxicación con organofosforados es el llamado el síndrome intermedio. El cual fue descrito por Sennanayake y Karallied en 1987 como un efecto neurotóxico de los organofosforados que aparece con posterioridad a los efectos agudos pero mucho antes de la neuropatía retardada. Aproximadamente el 20% de los pacientes después de la exposición a plaguicidas organofosforados pueden experimentar IMS (Abdollahi & Karami-Mohajeri, 2012). Como se indica en la tabla 2-3 su manifestación es una marcada debilidad de las vías respiratorias, el cuello, y los músculos proximales de las extremidades. La aparición tardía de la insuficiencia respiratoria asociada con el IMS son un importante contribuyente a la alta morbilidad, mortalidad y costo del tratamiento por intoxicación con OP. La mortalidad puede estar entre un rango de 15 a 40%, y la recuperación de los pacientes que sobreviven por lo general toma hasta 20 días. El síndrome intermedio no es un efecto directo de la inhibición de la AChE, de hecho sus mecanismos subyacentes exactos se desconocen. Una hipótesis es que la debilidad muscular puede ser consecuencia de la desensibilización de los receptores nicotínicos debido a la prolongada estimulación colinérgica. No existe un tratamiento específico para el síndrome intermedio y la intervención es exclusivamente de apoyo respondiendo a las características clínicas y electromiografías (Klaassen, 2008)(Abdollahi & Karami-Mohajeri, 2012)(Barguil Díaz, Lozano Mosquera, & Pinto Hernández, Julieth Katerine Aristizábal Maquilón, 2012).

Estudios han establecido que el desarrollo de IMS presenta una asociación clara con el plaguicida organofosforado en particular. El IMS ocurre después de la intoxicación por fentión, monocrotofos, dimetoato, metilparatión, fosmet, clorpirifos, fentoato, diclorvos y metamidofos (Abdollahi & Karami-Mohajeri, 2012).

### **2.5.2 Neurotoxicidad retardada**

La neurotoxicidad retardada o polineuropatía retrasada inducida por organofosforados o síndrome (OPIDP) es una axonopatía simétrica distal sensitivomotora que surge de forma rápida (1 a 3 semanas) después de la exposición a algunos organofosforados. Las manifestaciones se encuentran en la tabla 2-3. La OPIDP no está relacionada con la inhibición de la AChE, sino con la inhibición de una esterasa de la membrana del axón

denominada esterasa diana de neuropatía (NTE). La NTE está presente en los tejidos nerviosos así como en otros tejidos (por ejemplo, linfocitos). Varios OP pueden inhibir la NTE, dependiendo de su estructura química; así la fosforilación de la NTE por OP es similar a la observada para la AChE. Sin embargo, sólo los OP cuya estructura química conduce al envejecimiento de la NTE fosforilada (por un proceso análogo al descrito para la AChE) puede causar OPIDP. Otros compuestos que inhiben NTE, pero no pueden someterse a la reacción de envejecimiento no son neurotóxicos, lo que indica que la inhibición de la actividad catalítica de la NTE no es el mecanismo de la degeneración axonal. Para que se inicie la neurotoxicidad retardada, se necesita que la fosforilación y posterior envejecimiento de al menos el 70% de la NTE se realice, y este proceso de dos pasos se produce dentro de horas de la intoxicación. Cuando se manifiestan los primeros signos clínicos de la OPIDP semanas más tarde, la actividad de la NTE se ha recuperado.

De acuerdo a experimentos desarrollados con animales, algunos OP y CM inducen a la neuropatía retardada y otras axonopatías químicas sin inhibir la NTE, a este fenómeno se denomina promoción (Moretto & Lotyi, 2006). Algunos OP (metamidofos, triclorfón, clorpirifos) han causado OPIDP en los seres humanos, sobre todo como consecuencia de exposiciones sumamente altas asociadas con intentos de suicidio (Klaassen, 2008).

### **2.5.3 Tratamiento de la intoxicación aguda por plaguicidas organofosforados y carbamatos**

De acuerdo a la vía de absorción del tóxico, el tratamiento se inicia por la descontaminación externa e interna. Si ha sido ingerido se debe impedir la absorción intestinal y por ser liposolubles el desplazamiento hacia los depósitos grasos que son a menudo los fracasos de las terapias con oximas y de la depuración extrarenal, debido a reintoxicaciones endógenas. Se trata con catárticos de sulfato sódico o manitol o enema rectal o carbón activado a dosis reiteradas. También se utiliza hemoperfusión sobre carbón activo.

El antídoto para la intoxicación aguda con organofosforados es la atropina que actúa como antagonista, al competir con la acetilcolina y bloquea los receptores colinérgicos, pero no puede penetrar a los nicotínicos. Otros sustitutos se han utilizados pero su efecto no sobrepasa a la atropina, tales como: difenhidramina, escopolamina, glucopirrolato, ipratropina etc.

Los objetivos de suministrar sueros bicarbonatados son:

- Controlan el equilibrio electrolítico
- Ayudan la hidrólisis de los organofosforados, que en general son menos estables a pH alcalino
- Se evita la eliminación de la atropina porque esta disminuye a pH alcalino, aumentando su vida media y efectividad de la dosis.

Se utilizan oximas como regeneradores de la enzima acetilcolinesterasa como pralidoxima, obidoxima, trimidoxima etc. cuando la unión del organofosforado con acetilcolinesterasa es reciente, para desplazar el organofosforado de la unión con la enzima. Cuando es adicionada con la atropina se favorece una potenciación de ambas con menores requerimientos de dosis, sin embargo; se ha reportado hepatotoxicidad cuando la administración de las oximas se prolonga más de una semana (Repetto, 1995).

En el caso de la intoxicación con carbamatos el tratamiento es similar al de la intoxicación por organofosforados, aunque la administración de oximas no está indicada ya que el enlace carbamato-AChE es tan lábil que la enzima se regenera de forma espontánea, como se ha explicado el fenómeno en el mecanismo de acción.

## 2.6 Toxicología forense

Dentro de la práctica de una necropsia médico legal, se define la *causa de la muerte* como enfermedad o evento que desencadena la secuencia que lleva a la muerte. Por su parte, la *manera de muerte* son las circunstancias en que ocurrió la muerte de una persona y sigue la clasificación de los casos propuesta por la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE) con fines epidemiológicos: muerte natural, muerte accidental,

probable o ciertamente suicidio, probable o ciertamente homicidio, muerte de manera indeterminada y en estudio (Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, 2004) (Dolinak, Matshes, & Lew, 2005).

Para definir la causa y manera de muerte el patólogo o médico forense sigue su protocolo de necropsia que incluye desde la información registrada por la autoridad en el levantamiento del cuerpo hasta los hallazgos de la propia necropsia. En este proceso, existen decesos en que se requiere mayor investigación criminalística y/o estudios forenses complementarios. Es aquí donde se integra la toxicología forense para aportar resultados que permitan explicar los hallazgos postmortem del occiso y conocer el papel de un tóxico en el caso en que se investiga judicialmente una muerte (Dolinak et al., 2005) (DiMaio & DiMaio, 2001).

En efecto, la Toxicología Forense es el campo de la Toxicología concerniente a contribuir a determinar la causa de la muerte, o a establecer que grado de relación tiene una sustancia química con ella. Para lo cual, es necesario interpretar y determinar en qué circunstancia se encuentra la relación sustancia química - muerte de significancia médico-legal; esto es, si está asociada, relacionada, si la ha inducido, o ha sido directamente responsable de la misma. Se enfoca entonces la Toxicología forense en una Toxicología postmortem. (García & Repetto, 2008)(Tsokos, 2005) (DiMaio & DiMaio, 2001)

Por otro lado, la Toxicología forense en asocio con la Toxicología clínica estudia también la farmacología y propiedades bioquímicas de los medicamentos o tóxicos conforme a su vía de ingreso, absorción, distribución, metabolismo y excreción desde el organismo. Esta información es de suma importancia porque permite conocer las dosis terapéuticas y letales de un compuesto, con el fin de interpretar la causa de la muerte o establecer si la cantidad encontrada en la muestra biológica puede inducir algún cambio que afecta la salud y vida del ser humano (Skopp, 2010). En esta perspectiva determinar si la sustancia química es un plaguicida y de qué forma se encuentra presente, provee una resolución científica para el patólogo y/o médico forense en pro de precisar este fenómeno en un caso forense (Tsokos, 2006) (DiMaio & DiMaio, 2001).

En este contexto, los plaguicidas por su carácter tóxico representan un grupo importante de sustancias de estudio. Sin embargo, el término plaguicida involucra una familia compleja de compuestos, de propiedades fisicoquímicas diversas, por lo cual resulta difícil sistematizar su análisis, más aun en muestras heterogéneas por sí mismas como lo son los fluidos biológicos. Esta situación hace que exista numerosas técnicas específicas para el aislamiento e identificación de cada compuesto en particular, o se agrupen de acuerdo a la similitud de las características físicas y químicas (Salm et al., 2009) (Proença et al., 2004).

## **2.6.1 Hallazgos post-mortem de intoxicación fatal con organofosforados y carbamatos**

Inicialmente los signos y síntomas clínicos reportados en la historia médica pueden proporcionar información valiosa en un caso de sospecha de intoxicación fatal y puede facilitar la selección de muestras apropiadas en la necropsia. Sin embargo, se debe tener en cuenta, que estos síntomas pueden ser sutiles o pueden pasar desapercibidos por la presencia de enfermedades, especialmente en niños y ancianos (Skopp, 2010). Desafortunadamente en el momento de la necropsia no siempre se cuenta con la historia clínica previa al deceso que oriente al médico al abordaje del caso.

### **▪ Externos**

En los hallazgos externos de la intoxicación por plaguicidas se encuentra comúnmente los signos de la asfixia. Congestión de la cara y cianosis en labios, nariz, dedos y partes acras de las extremidades. Un hallazgo notable es el olor característico que emana del cuerpo, que ha sido descrito como de ajo o queroseno, puesto que algunos organofosforados son disueltos en este compuesto. También se encuentra espuma con tinción de sangre en la boca y nariz, y miosis (Skopp, 2010)(Tsokos, 2006).

### **▪ Internos**

En los hallazgos internos se encuentra la mucosa gástrica congestionada y puede aparecer hemorrágica y el contenido gástrico a menudo es grasoso y con espuma verdosa. El tracto respiratorio también está congestionado y las vías respiratorias

contienen exudado hemorrágico espumoso. Congestión pulmonar, edema pulmonar hemorrágico, y petequias subpleural. El cerebro se hincha y se observa una congestión visceral generalizada (Tsokos, 2006).

Estos hallazgos de la intoxicación con plaguicidas no son una característica patológica única de estos compuestos y por lo tanto se considera que no son específicos, pero ofrecen algunos indicios al patólogo o médico forense para la solicitud de análisis toxicológicos (Skopp, 2010)(Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, 2004)(Iii & Barnard, 2011)

## **2.6.2 Muestras en el análisis toxicológico forense**

La elección, recolección y preservación de la muestra constituye un paso significativo para el desarrollo y contribución del análisis toxicológico. Se considera que el éxito de un análisis y su interpretación dependen en gran manera de esta etapa. A continuación se enunciarán únicamente algunas de las muestras que pueden ser remitidas en caso de individuos fallecidos.

### **▪ Sangre**

En Toxicología clínica y forense la sangre es la matriz biológica por excelencia. Básicamente está compuesta por células suspendidas en el plasma. El plasma constituye la fase líquida y los elementos formes la fase sólida. Los elementos formes son una mezcla de glóbulos rojos (eritrocitos), glóbulos blancos (leucocitos) y plaquetas (trombocitos). En el plasma se encuentra múltiples proteínas, hormonas, lípidos, agua y gases incluyendo oxígeno, dióxido de carbono y nitrógeno. La sangre es el vehículo de transporte de los diferentes compuestos a los diversos órganos y estructuras del organismo (Organización Mundial de la Salud OMS, 1998).

La sangre post-mortem se puede tomar de dos sitios: sangre cardiaca y sangre periférica. La sangre cardiaca es tomada de alguno de los ventrículos del corazón, se prefiere el derecho. La sangre periférica se obtienen generalmente a partir de la vena femoral. Se prefieren las venas de las piernas a las venas de la cabeza y el cuello debido a la presencia anatómica de un mayor número de válvulas que resisten al movimiento de la sangre desde los intestinos (Steven B. Karch, MD, 2007). . Es decir, la sangre de

vena femoral se estima que es la muestra de elección, ya que ésta se encuentra más protegida de los fenómenos de redistribución; así como de invasión de bacterias (Skopp, 2010).

Como la sangre es el fluido biológico que está en equilibrio con todos los órganos del cuerpo, se considera que es la matriz que mejor refleja la exposición de los órganos en un momento dado a un xenobiótico como lo es un plaguicida (Dolinak et al., 2005). Esta matriz es ampliamente usada y aceptada para determinar qué tipo de compuesto y en qué concentración se encontraba presente en el momento del deceso, resultado que proporciona una estrecha aproximación a lo que el cerebro ha sido expuesto justo antes de la muerte (Klaassen, 2008) (Byard & Butzbach, 2012). Típicamente los analitos se encuentran en concentraciones muy bajas en esta matriz, en el orden de  $\mu\text{g/mL}$  o menores. El análisis cuantitativo se lleva a cabo en sangre periférica.

#### ▪ **Contenido gástrico**

El contenido gástrico es otra matriz biológica empleada en el análisis toxicológico forense, específicamente en casos de muerte rápida por intoxicación aguda donde la vía de ingreso ha sido la oral y cantidades del agente sin absorber puede encontrarse en el estómago (Steven B. Karch, MD, 2007).

#### ▪ **Orina**

La orina o lavado vesical es la matriz biológica que permite determinar la eliminación del compuesto inicial o sus metabolitos, por lo tanto proporciona información del cuadro toxicocinético de la biotransformación (DiMaio & DiMaio, 2001). Es decir, refleja de forma cualitativa la exposición de drogas, medicamentos o tóxicos ante-mortem. Esta matriz es generalmente desprovista de proteínas séricas circulantes, lípidos y otros compuestos de gran peso molecular debido a la proceso de filtración renal, característica que permite una simplificación en la preparación de la muestra para el análisis (Steven B. Karch, MD, 2007).

## 2.7 Carbamatos y organofosforados de interés en toxicología forense

Los grupos de plaguicidas organofosforados y carbamatos son importantes en el marco forense de nuestro país por las muertes asociados a estos agentes como se ha manifestado. El Grupo de Toxicología de la Regional Bogotá del Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses estima en su base de datos que de las muertes causadas por plaguicidas en Bogotá en el 2011, se encuentra asociado el aldicarb (47%) y el carbofurano (35%) (Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, 2011). Igualmente estima que en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá, el carbofurano se ha asociado en 47,5% de los casos, seguido por el metamidofos con el 17,5% de los casos. El aldicarb representa el 5% de las muertes de estos dos últimos lugares de procedencia (Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, 2011). Los valores restantes corresponden a otros plaguicidas.

Un estudio epidemiológico llevado a cabo en Bucaramanga también presenta que los carbamatos son los plaguicidas con mayor frecuencia asociados a intoxicaciones (37,8%) que llegan a la morgue de esta ciudad y entre los carbamatos analizados el aldicarb (41,2%) y carbofuran (35,3%) fueron los más frecuentes en este tipo de eventos fatales (Ortiz & Ochoa, 2010).

El carbofurano y metamidofos se encuentran como plaguicidas en Cundinamarca y Boyacá por ser utilizados para el control de plagas en los cultivos. Por su parte, el aldicarb es vendido a nivel urbano (especialmente en Bogotá) como producto matarratas en forma informal en las calles y plazas de mercado sin regulación, circunstancia que puede incidir en su empleo. La facilidad en la adquisición de estos productos podría representar un factor de riesgo para las intoxicaciones, principalmente con fines homicidas o suicidas que podría prevenirse si su venta y distribución se normalizan.

El aporte de la toxicología forense a la resolución científica de un problema judicial se fundamenta en la toxicología analítica, sus desarrollos, técnicas analíticas y tendencias. Análisis toxicológicos cualitativos y cuantitativos confiables son un requisito para la correcta interpretación de los hallazgos toxicológicos forenses. De hecho, resultados dudosos conllevan a subestimar o sobreestimar un efecto o una relación toxicológica e

inferir falsas interpretaciones que no sólo podrían ser impugnadas en la corte sino que, y lo más grave suscitar consecuencias legales injustificadas a un sospechoso. Debido a todas estas consideraciones, es de suma importancia forense contar con métodos analíticos validados que proporcionen confiabilidad (Peters, Drummer, & Musshoff, 2007)(SOFT / AAFS Forensic Laboratory Guidelines, 2006).

El crecimiento de la toxicología forense está ligado necesariamente con los avances importantes de la toxicología analítica que admiten realizar y mejorar los procedimientos de extracción, separación e identificación de sustancias tóxicas desde matrices biológicas o de carácter ambiental, así como su determinación cuantitativa. El desarrollo de técnicas instrumentales y procesos de tratamiento de muestra, permiten aumentar la capacidad para detectar e identificar la presencia de compuestos en pequeñísimas cantidades. Los plaguicidas no son ajenos a estos avances tecnológicos, cada vez se reportan más estudios a nivel internacional y nacional del análisis de plaguicidas en el contexto ambiental en muestras como aguas, frutas, suelos y vegetales en pro de proporcionar métodos multiresiduos de tratamiento de muestra, de detección y cuantificación. (Wilkowska & Biziuk, 2011) (Sinha, Vasudev, & Vishnu Vardhana Rao, 2011) (Ahmed, 2001) (García de Llasera & Reyes-Reyes, 2009). Sin embargo, estos estudios analíticos de plaguicidas en muestras de interés ambiental han excedido en número a los reportados para estos mismos compuestos en el campo de la toxicología forense, por lo tanto, se puede considerar a esta última como un área en actual crecimiento (Dulaurent et al., 2010)(Salihovic et al., 2012)(Tarbah et al., 2001).

Actualmente en el Instituto de Medicina legal y Ciencias Forenses en su laboratorio de Toxicología se ha empleado la técnica de Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS), válida para el análisis de organofosforados y carbamatos, sin embargo; esta técnica está limitada para compuestos volátiles, de bajo peso molecular y termoestables. Tal es el caso del aldicarb que es térmicamente lábil y podría degradarse en el puerto de inyección. Los límites de detección del método empleado para el aldicarb, carbofurano y metamidofos en sangre utilizando GC/MS se encuentran entre 0,5 – 5,0 µg/mL.

En esta perspectiva, el desarrollo y validación de un método que determine y cuantifique aldicarb, carbofurano y metamidofos en sangre por LC-MS/MS contribuye al crecimiento analítico y forense de estos plaguicidas con mejor sensibilidad, especificidad y menor cantidad de muestra necesaria para obtener el resultado en el laboratorio de toxicología. Se convierte de esta forma en una metodología complementaria a la existente por GC/MS, en mayor medida cuando la concentración del plaguicida en la sangre se encuentra a menor concentración que el límite de detección de este método, debido a circunstancias que rodean el hecho como el tratamiento médico.

La literatura ha reportado concentraciones de aldicarb en sangre postmortem desde 4,8 - 11 µg/mL (Proença et al., 2004) (Baselt, 2004). El carbofuran desde 0,3 hasta 62 µg/mL (Tennakoon et al., 2012) (Baselt, 2004) (Ameno et al., 2001) (Lacassie, Marquet, et al., 2001) (Mostafa et al., 2011) y de metamidofos desde 6,2 hasta 161 µg/mL y en suero hasta 558 µg/mL (Adachi et al., 2008) (Baselt, 2004). En la mayoría de casos no se tiene información sobre el tiempo transcurrido entre la ingestión, la toma de la muestra y el análisis toxicológico.

Bajo el fundamento del principio científico y forense que la detección o identificación inicial de un tóxico debe ser confirmado siempre que sea posible por una segunda técnica basada en un principio químico diferente, el método preexistente por GC/MS podría representar el análisis preliminar de los plaguicidas aldicarb, carbofuran y metamidofos y el método por LC-MS/MS sería el método confirmatorio (SOFT / AAFS Forensic Laboratory Guidelines, 2006). De igual manera, el análisis de los plaguicidas en estudio en contenido gástrico en una intoxicación aguda se llevaría a cabo por GC/MS puesto que se espera encontrar altas concentraciones del analito, mientras que en sangre como se espera una variedad de concentraciones pero mucho más bajas dependiendo de la cantidad ingerida, el tiempo transcurrido y los tratamientos médicos se realizaría por LC-MS/MS.

En el contexto del sistema penal acusatorio, los informes periciales emitidos por el perito registran el resultado del análisis toxicológico forense y representan una evidencia que al momento de ser sustentada en la corte puede ser cuestionada. Las repercusiones legales que genera un análisis toxicológico forense y la responsabilidad que amerita el resultado en la decisión jurídica, son las consideraciones que explican la necesidad de

contar con metodologías analíticas confiables. Al respecto, con los desarrollos tecnológicos de técnicas analíticas como la LC-MS/MS que ofrece un mayor alcance de análisis y mejor sensibilidad para muchos plaguicidas en comparación a la GC/MS (Alder & Greulich, 2006), el laboratorio de toxicología se orienta hacia el desarrollo de nuevos métodos de análisis que mejoren la sensibilidad y especificidad de los tóxicos que se encuentran en su casuística. En este caso, de los plaguicidas aldicarb, carbofurano y metamidofos.

## **2.8 Cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem LC-MS/MS**

Desde el punto de vista analítico es de suma importancia la selección de la técnica que mejor se adapte y responda a las necesidades del problema analítico que se pretende afrontar. Durante años, la determinación de plaguicidas con características químicas de mediana a baja polaridad, volátiles y con cierta estabilidad térmica se ha realizado mediante la cromatografía de gases (GC) acoplada a diferentes detectores tales como: captura de electrones (ECD), detector específico de nitrógeno fósforo (NPD), detector fotométrico de llama (FPD) y espectrómetro de masas (MS). Los plaguicidas de alta polaridad o inestables térmicamente se han analizado utilizando cromatografía líquida (LC) acoplada a detectores de ultravioleta (UV), de arreglo de diodos (DAD) y fluorescencia (FD). Entre estas técnicas, la cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC/MS) ha sido la más aplicada debido a su selectividad y sensibilidad (Cappiello., 2007)(Brea, 2009) (Alder & Greulich, 2006).

El desarrollo de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) precedió a la cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC/MS) por un largo número de años y por lo tanto las aplicaciones más frecuentes eran en las áreas ambientales y toxicológicas. (Cervera, Portolés, Pitarch, Beltrán, & Hernández, 2012)(García-Rodríguez, Cela-Torrijos, Lorenzo-Ferreira, & Carro-Díaz, 2012)(Cazorla-Reyes et al., 2011), algunas basadas en los métodos estándar suministrados por la EPA (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos EPA., 2012).

Los requerimientos de una muestra para ser analizada por GC/MS radica en que los compuestos deben ser volátiles y ser estables térmicamente bajo las condiciones de temperatura del inyector, la columna y del horno para obtener la separación. Sin embargo, no todos los compuestos de interés son los suficientemente volátiles, por lo tanto se recurre a procesos de derivatización química para enmascarar los grupos funcionales polares y de ese modo aumentar la volatilidad y mejorar la estabilidad térmica antes de ser inyectados por GC/MS. Etapas que pueden generar un aumento en el costo y tiempo en los análisis, la introducción de errores en la manipulación de la muestra y la exposición del analista a sustancias tóxicas como lo son muchos derivatizantes. En esta medida, el surgimiento de la cromatografía líquida con espectrometría de masas LC/MS ha ayudado a resolver la problemática analítica respecto a los analitos hidrofílicos, termolábiles y no volátiles, que no son cubiertos suficientemente por la técnica establecida de GC/MS. (Ardrey, 2003) (McMaster, 2005) (Hocart, 2010).

### **2.8.1 Cromatografía líquida (LC)**

La Cromatografía líquida (LC) es una técnica que separa los componentes de una muestra cuando se hacen interaccionar con una fase estacionaria sólida que compone la columna cromatográfica y una fase móvil líquida. La fase móvil se compone por lo general de una mezcla de solventes con propiedades químicas específicas que establecen el tipo y fuerza de interacción entre el solvente y la muestra. Por otro lado, la columna cromatográfica puede considerarse el corazón de la cromatografía líquida, en torno de la cual ocurren distintos tipos de interacción. Interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones dipolares y electrostáticas, son las responsables de la mayor o menor afinidad de cada compuesto de la muestra por la fase estacionaria o por la fase móvil. En consecuencia, la combinación correcta de una variedad de condiciones de operación tales como el tipo de fase estacionaria y la fase móvil, longitud de la columna y el diámetro, la velocidad de flujo de la fase móvil, temperatura de la columna y tamaño de la muestra son factores determinantes en la separación y en el uso exitoso de la cromatografía líquida. (McMaster, 2005)(Guillarme, Nguyen, Rudaz, & Veuthey, 2007)(Gama, Da Costa Silva, Collins, & Bottoli, 2012).

Existen diferentes modos de separación en cromatografía líquida de acuerdo a las fuerzas de interacción que gobiernan la separación. Para la separación de los plaguicidas en LC/MS tándem se han empleado tres modos principalmente: fase reversa (RPLC), fase reversa de par iónico (IPRPLC), interacción hidrófila (HILIC) e intercambio iónico (IELC); por su robustez y facilidad de desarrollo del método. Cerca de un 80% de las aplicaciones donde se separa los componentes de una muestra utilizando cromatografía líquida son llevadas a cabo en RPLC (Picó, Blasco, & Font, 2004)(McMaster, 2005).

## **2.8.2 Cromatografía líquida en fase reversa (RPLC)**

Se denomina cromatografía líquida en fase reversa cuando la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. Esta configuración hace que los analitos se separen de acuerdo a su grado de hidrofobicidad. Frecuentemente, la fase estacionaria más utilizada ha sido la sílica (Si) enlazada químicamente a una cadena alquílica de 18 átomos de carbono, denominada como columna C18 u octadecilsilano (ODS). También existen con 8 átomos de carbono o cadenas alquílicas más cortas, grupos ciclohexilo y fenilo. Los grupos fenilo son más polares en comparación con los grupos alquilo (Ackley & Joseph A. Caruso, 2003).

La fase móvil está constituida por mezclas de solventes que definen la fuerza de elución y selectividad para la separación, en general se utiliza el agua y un modificador orgánico como el metanol, el acetonitrilo o el tetrahidrofurano; con o sin el agregado de aditivos como sales inorgánicas o de apareamiento iónico. La separación se lleva a cabo dependiendo de la polaridad de los analitos y la proporción del modificador orgánico, así los compuestos más polares son eluidos rápidamente, mientras que los no polares son retenidos con mayor fuerza y en ocasiones se necesita altos porcentajes de los modificadores orgánicos para ser eluidos. Las interacciones analito solvente son de importancia en fase reversa ya que las interacciones entre la fase estacionaria y el analito son débiles y básicamente son gobernadas por interacciones de Van der Waals no específicas. En esencia, la estructura molecular de cada componente de la muestra, la composición de la fase móvil y el flujo aplicado son determinantes en el tiempo que eluye cada analito desde el cromatógrafo líquido e ingresa al detector (Niessen & Group, 2006).

Para los métodos en RPLC se han utilizado sales y reactivos como aditivos en la fase móvil, con los siguientes propósitos: el control y regulación del pH que puede mejorar la forma del pico en compuestos ácidos y básicos; y en segunda instancia para favorecer la ionización por protonación  $[M+H]^+$  o desprotonación  $[M-H]^-$  del analito en estudio. Al respecto, los buffers de fosfatos son comúnmente usados en cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) pero no son recomendados cuando se utiliza un espectrómetro de masas como detector, debido a que las sales de fosfato no son volátiles y pueden precipitar en la fuente iónica después de la evaporación del solvente afectando el desempeño del LC/MS. Las sales de acetato de amonio o formiato de amonio son más adecuadas para la fase móvil en las aplicaciones de LC/MS y pueden ser ajustadas con ácido acético o fórmico, o con hidróxido de amonio para alcanzar el rango de pH deseado (Picó et al., 2004).

En pocas palabras, con RPLC es posible separar plaguicidas de mediana polaridad, polares e iónicos de acuerdo a su diferencia de hidrofobicidad a través de la partición entre la fase móvil polar y la fase estacionaria apolar o mucho menos polar que la fase móvil (Picó et al., 2004).

### **2.8.3 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS)**

La espectrometría de masas (MS) es la técnica analítica que se basa en la producción de iones en fase gaseosa, que posteriormente son separados y detectados de acuerdo a su relación de masa a carga ( $m/z$ ). Un espectrómetro de masas es un instrumento que mide precisamente la abundancia de las moléculas que han sido convertidas a iones. El resultado es un espectro de masas que consiste en un gráfico de la abundancia relativa de los iones generados en función de la relación  $m/z$ . Los analitos pueden ser ionizados térmicamente, por campos eléctricos o por impacto de electrones de alta energía, iones o fotones. Los iones obtenidos pueden ser átomos ionizados, grupos de átomos ionizados (clúster), moléculas o fragmentos asociados de éstas (Gross, 2011).

Típicamente un espectrómetro de masas es un instrumento que se compone de las siguientes partes: 1) un sistema para la introducción de la muestra, 2) una fuente de

ionización, 3) uno o varios analizadores de masas, 4) un detector y 5) un sistema de procesamiento de datos. Algunos instrumentos combinan el sistema de introducción de la muestra con la fuente de ionización o el detector con el analizador (Gross, 2011).

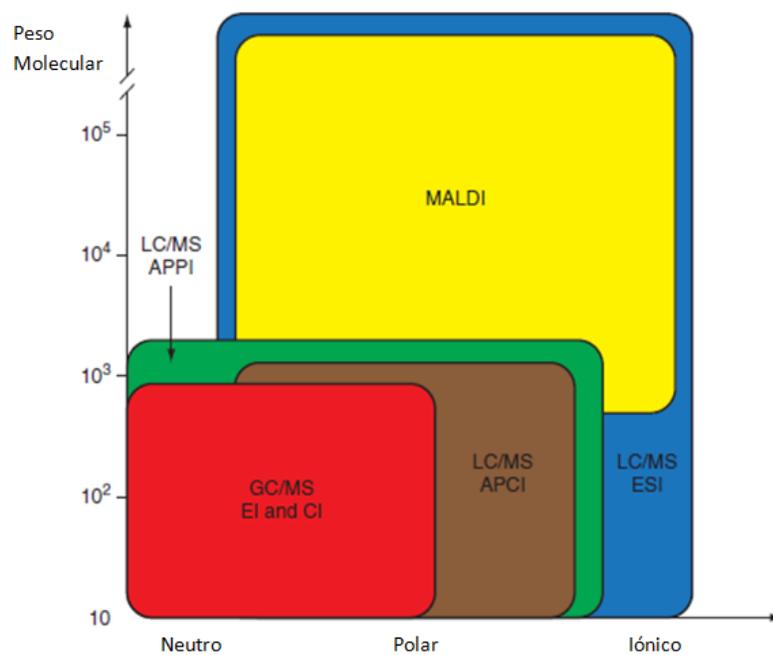
La MS se considera una técnica esencial en la identificación y cuantificación de compuestos, principalmente debido a su velocidad, sensibilidad, selectividad, y su versatilidad en el análisis de sólidos, líquidos y gases. La contribución de la MS en la ciencia es amplia e interdisciplinaria, aplicándose en las áreas de la física, química, biología, bioquímica y medicina entre otras (Wanner & Hofner, 2007)(Hocart, 2010). El acoplamiento de un espectrómetro de masas a un cromatógrafo líquido se convierte en una herramienta que conjuga un método instrumental de separación y un sistema de detección, para la determinación, identificación y cuantificación de compuestos.

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS) satisface los requerimientos de los análisis en el campo de la toxicología clínica y forense, puesto que aparte de las características del MS ya mencionadas, el acople con la LC presenta la capacidad de analizar compuestos termolábiles, hidrofílicos y no volátiles. Además se puede programar de acuerdo a las características del instrumento para realizar “screening” de varios analitos al mismo tiempo, procedimiento que es muy útil en casos de diagnóstico, muerte en estudio y monitoreo de metabolitos activos. Sumado a lo anterior, su gradual disminución en el costo han convertido a la LC/MS en una técnica importante en los laboratorios de toxicología clínica y forense (Peters, 2011)(Gallardo, Barroso, & Queiroz, 2009) (Wood et al., 2006) (Yinon, 2004)(Marquet, 2002).

El auge de la técnica LC/MS se ha potenciado desde la introducción de las fuentes de ionización o interfases que permitieron la remoción de la fase móvil proveniente del cromatógrafo con flujos hasta de 1mL/min. El diseño de las interfases de ionización mediaron para que la cromatografía líquida y la espectrometría de masas fuera posible. En esencia las interfases tiene dos funciones principales: la eliminación del solvente de la fase móvil y la introducción de los analitos en estudio en fase gaseosa al detector MS. Es decir, una vez la muestra es ionizada, los iones formados se enfocan hacia el analizador del espectrómetro de masas donde se lleva a cabo su separación y detección. Muchas fuentes de ionización han sido utilizadas tales como: haz de partículas (PB), termospray (TSP), bombardeo atómico rápido (FAB), ionización electrospray por desorción (DESI),

fotoionización (PI), fotoionización a presión atmosférica (APPI), ionización láser a presión atmosférica (APCI), impacto electrónico (EI), ionización química (CI), desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) y la ionización a presión atmosférica (API). La interfase más usada con LC/MS es la (API) con sus dos tipos: Electrospray (ESI) y la ionización química a presión atmosférica (APCI) (Hoffmann & Stroobant, 2007) (Figura 2-10).

**Figura 2-10:** Rangos aproximados de polaridad y tamaño del analito de acuerdo a las diferentes técnicas de ionización. Modificada de (Hocart, 2010).

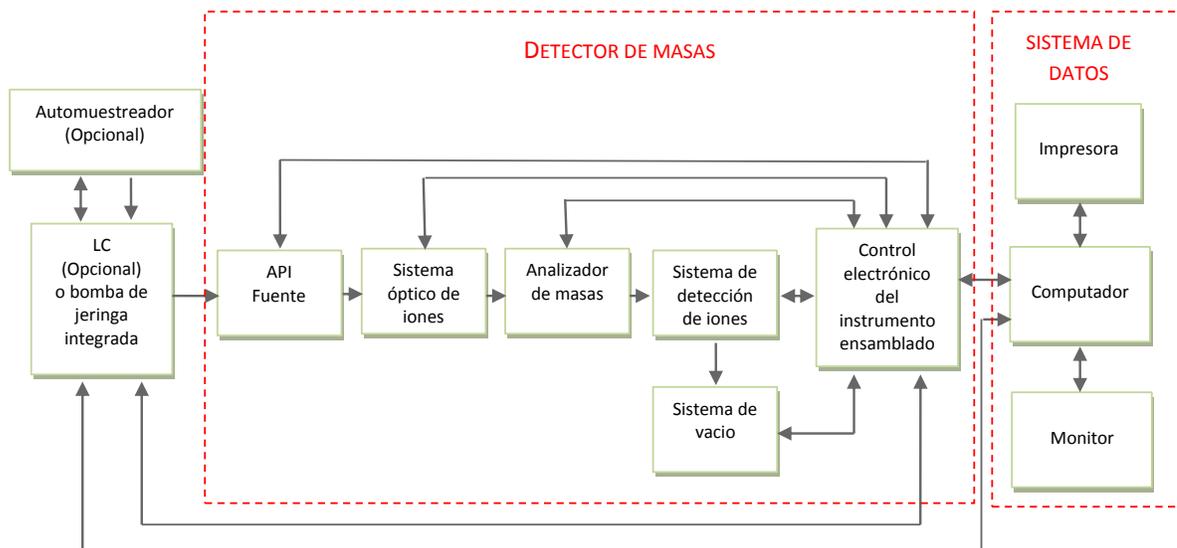


La fuente de ionización API es una técnica de ionización suave en comparación a la ionización fuerte utilizada por GC/MS, lo que significa en términos de análisis de datos que las librerías empleadas para GC/MS no son aplicables a LC/MS. Por otro lado, las aplicaciones para plaguicidas de la interfase API utilizando ESI y APCI han sido numerosas (Picó et al., 2004) (Petrovic et al., 2010) (Alder & Greulich, 2006), la elección de la interfase más sensible en el desarrollo de un método depende de la estructura química del plaguicida, de sus propiedades fisicoquímicas y del efecto matriz que se genere durante el proceso (Figura 2-10).

En el presente estudio se utilizó efectivamente la interfase electrospray (ESI) en un equipo LC/MS Thermo Finnigan LCQ Advantage Max para la identificación y

cuantificación de los plaguicidas en análisis. El LCQ Advantage Max consiste en tres partes principalmente: cromatógrafo líquido, fuente de ionización electrospray (ESI) y el analizador de trampa de iones (IT). Teniendo en consideración esta configuración, se introducirá con mayor profundidad los componentes esenciales de cada uno de los pasos que involucra la MS (Figura 2-11).

**Figura 2-11:** Diagrama funcional de bloques de un equipo LC-MS. (Thermo Electron Corporation, 2003).

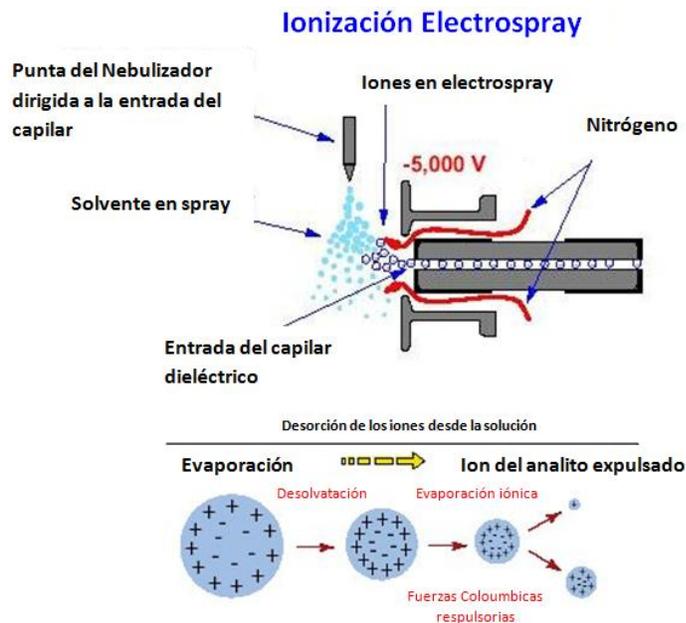


### ▪ Ionización por electrospray (ESI)

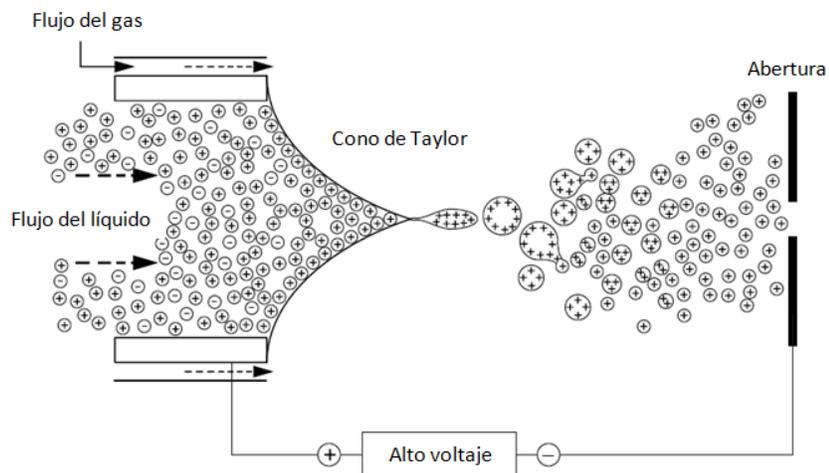
Dentro de las formas de ionización que se realizan en las fuentes API se encuentra la ionización electrospray o electronebulización (ESI), que consiste en una técnica de ionización suave en donde se aplica un voltaje de 5 – 10 kV entre el capilar de entrada de la muestra y el contraelectrodo a presión atmosférica, el efecto del campo eléctrico hace que la muestra salga del capilar formando un cono (cono de Taylor) a partir del que se generan pequeñas gotas cargadas eléctricamente (Figuras 2-12 y 2-13). A medida que estas gotas avanzan por la cámara de desolvatación el solvente se evapora por la acción de un flujo de gas inerte coaxial al flujo de la fase móvil y entonces el tamaño de la gota disminuye, haciendo que la densidad de carga eléctrica en su superficie aumente hasta llegar a un punto crítico conocido como el Límite de Rayleigh. En este punto las fuerzas coulombianas de repulsión de los iones vencen la tensión superficial que mantiene

unidas las gotas en forma esférica causando su ruptura y los iones pasan a fase gaseosa. Los iones formados pasan a través de un orificio cónico a una región de vacío intermedio y desde allí a través de una pequeña abertura en el alto vacío del analizador de masas (Figura 2-12) (Hoffmann & Stroobant, 2007)(McMaster, 2005)(Ekman, Silberring, Westman-Brinkmalm, & Kraj, 2009).

**Figura 2-12:** Ionización electrospray. Modificada de (Lopez, 2013).



**Figura 2-13:** Formación del cono de Taylor en la ionización electrospray. Modificada de (Ekman et al., 2009).



El nitrógeno se utiliza como gas nebulizador en la interfase API, el cual se encarga de repeler las gotas cargadas que salen de la aguja y las transporta a través de la fuente de iones. Puede ser aplicado como gas de arrastre que fluye en la interfase y causa la desagregación del solvente y la reducción de aductos. Así mismo, el nitrógeno puede ser aplicado como auxiliar, en este caso el gas fluye a través de la abertura de la fuente en forma concéntrica afectando la dirección del vapor para lograr que la evaporización sea enfocada y la desolvatación mejorada. El gas auxiliar también ayuda a disminuir la humedad en la fuente de ionización. Normalmente el flujo del gas auxiliar para ESI es de 10 a 20 unidades y no es necesario utilizarlo si el flujo de la muestra está por debajo de 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ , en efecto a mayor velocidad de flujo de la muestra se necesita mayor cantidad de gas para obtener una óptima ionización por electrospray (ThermoFisher, 2011).

Las reacciones de ionización del analito involucran reacciones del tipo ion – molécula que se desarrollan entre los iones en fase gaseosa provenientes de la solución buffer de la fase móvil con la molécula neutra del analito. Evento que ocurre ya sea en la superficie de la gota o en la fase gaseosa después de la desolvatación de las moléculas neutras. La ionización ESI es un proceso suave que induce a una pequeña fragmentación, pero en el caso de moléculas con varios sitios activos genera una distribución de sitios cargados. En efecto, la naturaleza y distribución de las cargas son producto del solvente utilizado. Así, para solventes próticos como las mezclas de agua con metanol o acetonitrilo, los iones de la muestra serán protonados  $[M+nH]^{n+}$  o desprotonados,  $[M-nH]^{n-}$ , para formar series de iones multicargados. El ácido fórmico o acético adicionado como aditivo favorece la protonación, en cambio el acetato de amonio favorece la desprotonación. Por otro lado, la presencia de especies iónicas provenientes del solvente o del material del laboratorio como metales alcalinos o sales de amonio, pueden formar aductos en el proceso de ionización. En otras palabras, un espectro obtenido de una ionización por ESI es un conjunto de señales discretas a lo largo del dominio espectral que se pueden presentar básicamente como: (a) en modo positivo, iones de moléculas protonadas, aductos de sodio, potasio o amonio; y (b) en modo negativo, iones moleculares desprotonados o aductos de formiato o acetato (Niessen & Group, 2006)(Hocart, 2010).

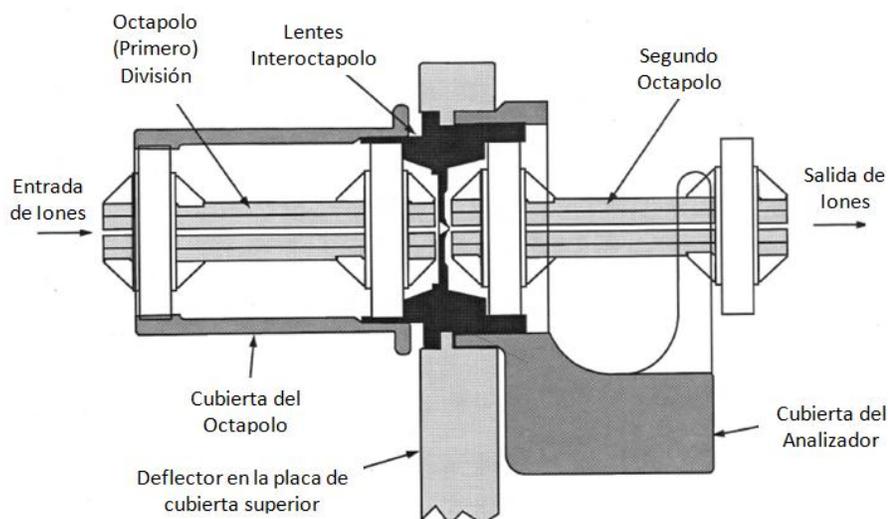
El ESI es especialmente útil para el análisis de biomoléculas grandes, tales como proteínas, péptidos y oligonucleótidos, pero también puede analizar moléculas más

pequeñas como lo son los plaguicidas. Comparando la idoneidad de la ionización ESI con respecto a la APCI para muchos plaguicidas, se ha identificado la ESI como la interfase más universal (Alder & Greulich, 2006).

### ▪ Sistema óptico de iones

El sistema óptico es el encargado de transmitir los iones desde la fuente API al analizador de masas (Figura 2-14). En el equipo LCQ Advantage Max el sistema óptico de iones consiste de dos octapolos y unas lentes interoctapolos. Cada octapolo es un arreglo octagonal de varillas cilíndricas que actúan como un dispositivo de transmisión de iones. Para lograrlo utiliza un campo eléctrico que guía a los iones a través del eje del octapolo, provisto por un voltaje de radiofrecuencia RF (2.45 MHz, 400 V pico a pico) y un voltaje de corriente directa de salida (típica entre -10 a 10 V). Durante la transmisión, el voltaje de salida es negativo para iones positivos y positivo para iones negativos. El voltaje RF del octapolo se apaga durante el análisis de masas (ThermoFisher, 2011).

**Figura 2-14:** Corte transversal del sistema óptico del equipo LCQ Advantage Max. (Thermo Electron Corporation, 2003).



Los octapolos son separados por unas lentes interoctapolos que asisten el enfoque y la ganancia de iones y también sirven como un desvío entre la región del primer octapolo y la región del analizador en el receptor de vacío. Para optimizar los voltajes que son aplicados a los octapolos y en la lentes interoctapolos se maximiza el flujo de iones que

van hacia el analizador por medio del procedimiento denominado “tune” (ThermoFisher, 2011).

### ▪ Analizador de masas

Una vez la muestra ha sido ionizada por la interfase ESI y transportados por el sistema óptico, los iones pasan al analizador de masas donde son separados de acuerdo a su relación  $m/z$ . El analizador de masas se considera como el corazón del espectrómetro de masas y la separación se fundamenta en diferentes principios como se muestra en la tabla 2-4.

**Tabla 2-4:** Tipos de analizadores utilizados en espectrometría de masas. Modificada de (Hoffmann & Stroobant, 2007).

| Tipo de analizador   | Principio de separación             | Símbolo         |
|--|-------------------------------------|-----------------|
| Sector eléctrico   | Energía cinética                    | <b>E o ESA</b>  |
| Sector magnético   | Momentum                            | <b>B</b>        |
| Cuadrupolo   | $m/z$ Estabilidad de la trayectoria | <b>Q</b>        |
| Trampa de iones  | $m/z$ Frecuencias de resonancia     | <b>IT o QIT</b> |
| Tiempo de vuelo  | $m/z$ Velocidad (Tiempo de vuelo)   | <b>TOF</b>      |
| Resonancia de ion ciclotrónico con transformada de fourier | $m/z$ Frecuencias de resonancia     | <b>FTICR</b>    |
| Orbitrap con transformada de Fourier                       | $m/z$ Frecuencias de resonancia     | <b>FT- OT</b>   |

Todos los analizadores de masas usan campos eléctricos estáticos o dinámicos y campos magnéticos que funcionan solos o combinados. Precisamente las diferencias entre los analizadores radican en la manera en que estos campos son utilizados para alcanzar la separación. Existen también los sistemas híbridos que combinan dos tipos de analizadores, por ejemplo el cuadrupolo con tiempo de vuelo Q-TOF (Hoffmann & Stroobant, 2007)(Ekman et al., 2009). El presente estudio fue llevado a cabo utilizando una trampa de iones por lo cual se enfocará la atención en este analizador.

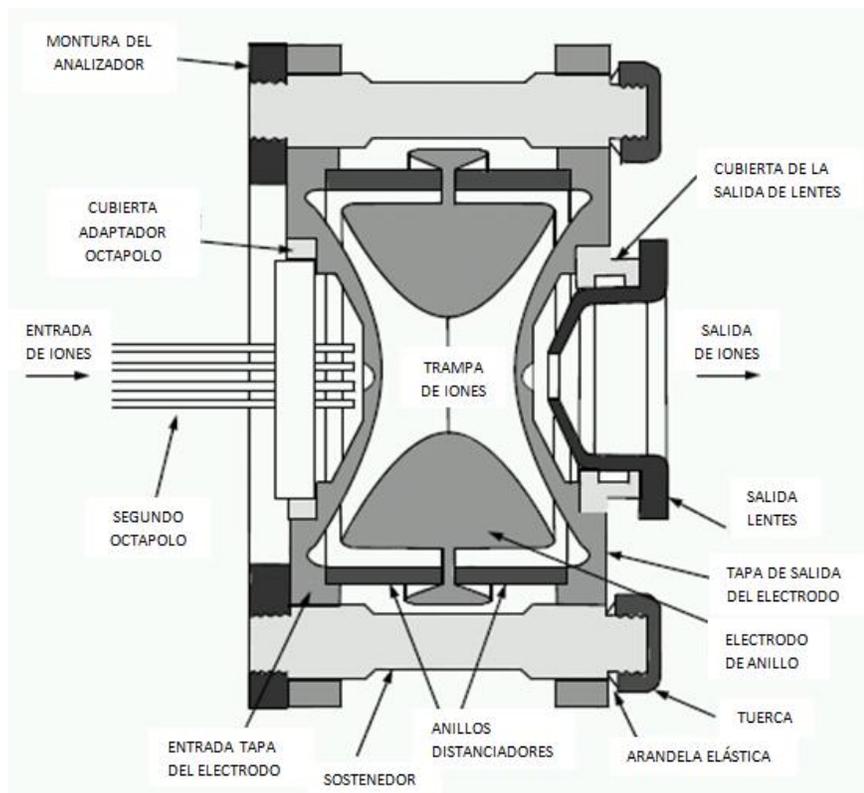
### ▪ Analizador de trampa de iones (IT)

Una trampa de iones (IT) es un dispositivo que utiliza un campo eléctrico oscilante para almacenar iones (Figura 2-15). La trampa de iones funciona mediante el uso de un

campo de radiofrecuencia (RF) cuadrupolar que atrapa los iones en dos o tres dimensiones. Por lo tanto, las trampas de iones se pueden clasificar en dos tipos: la trampa de iones 3D o la trampa de iones 2D. La trampa de iones 3D fueron también nombradas como cuadrupolo trampa de iones (QIT) y la trampa de iones 2D son conocidas como trampa de iones lineal (LIT) (Hoffmann & Stroobant, 2007). El LCQ Advantage Max utilizado para el presente estudio está provisto de un analizador de trampa de iones 3D, por lo tanto se encamina su funcionamiento en este QIT.

El analizador cuadrupolo trampa de iones QIT es donde se realiza el análisis de masas, esto es; los iones se almacenan, se separan, se disocian por colisión inducida (CID) y por último remueven del analizador para preparar la trampa a la próxima secuencia de eventos. El analizador de masas está compuesto de tres electrodos de acero inoxidable: un electrodo de entrada, un electrodo de salida y el electrodo de anillo. Las superficies interiores de los electrodos son hipérbolas. Este conjunto de electrodos forma una cavidad en la cual ocurre el análisis de masas (Hocart, 2010)

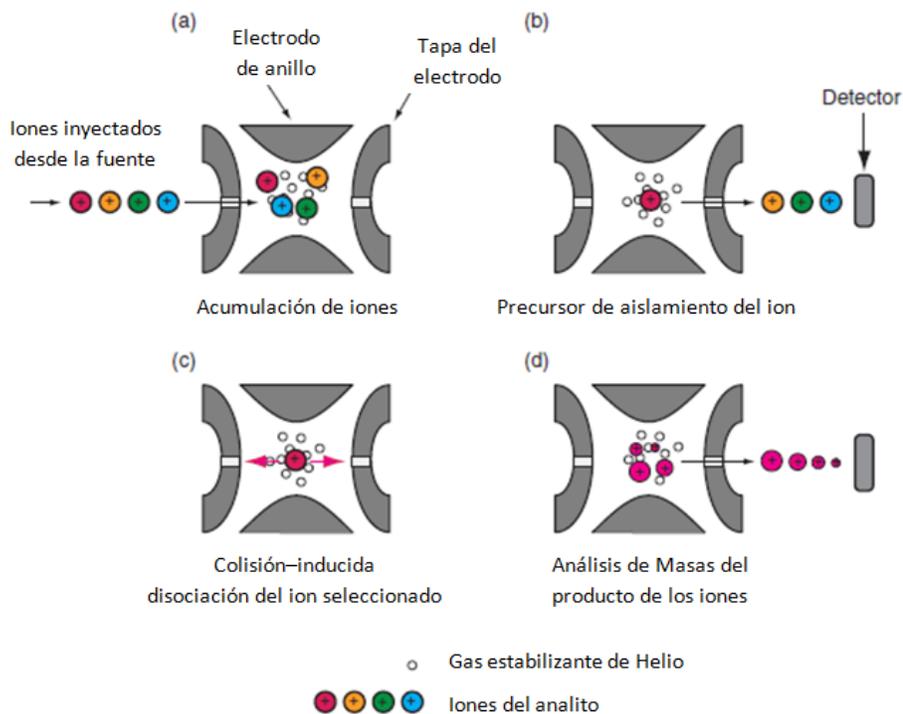
**Figura 2-15:** Corte transversal del analizador de masas. (Thermo Electron Corporation, 2003).



Como se observa en la gráfica el electrodo de entrada se encuentra cerca al sistema óptico y el electrodo de salida está cerca al sistema de detección de iones. Por su parte el electrodo de anillo se encuentra localizado entre los dos electrodos extremos. Mediante la aplicación de un potencial de RF introducido por el electrodo de anillo, los iones ingresan al campo activo de captura donde aumentan la amplitud de su movimiento oscilatorio inducido, hasta el momento que son expulsados de la cavidad de la trampa de acuerdo a sus masas por cualquiera de los electrodos extremos. La energía cinética de los iones en la trampa es disipada durante las colisiones repetitivas con átomos de gas. De hecho, la cavidad del analizador de masas contiene helio como gas amortiguador y activador de las colisiones. El flujo de gas helio dentro de la trampa de iones es de aproximadamente 1 mL/min y es regulado por el medidor de presión y el capilar restrictivo. Así mismo, la presión parcial del helio dentro del analizador se mantiene aproximadamente a 0,1 Pa ( $1 \times 10^{-3}$  Torr). Tanto la sensibilidad como la exactitud de las masas son significativamente mejoradas con la presencia de helio (Hocart, 2010)(Thermo Electron Corporation, 2003). El movimiento de los iones y su estabilidad en la trampa se describe matemáticamente por las soluciones de segundo orden de las ecuaciones diferenciales desarrolladas por Mathieu en 1868 (Hoffmann & Stroobant, 2007).

En el proceso descrito se pueden entonces monitorear los iones que salen de la trampa para crear el clásico espectro de masas de barrido completo "full scan". De forma alternativa, un ion en particular puede ser seleccionado es decir separado y el voltaje de RF se aplica sobre los electrodos de entrada y salida para causar la disociación por colisión inducida (CID) y obtener de esta manera los iones productos ( $MS^2$ ) (Figura 2-16). Este proceso completo se puede repetir con el último ion obtenido y el fragmento que se obtendrá es un ( $MS^3$ ), igualmente se puede repetir la separación y fragmentación varias veces siempre que los iones restantes sean suficientes en la trampa para proporcionar una adecuada relación señal-ruido (S/N) (Hocart, 2010). La magnitud del voltaje aplicado para trabajar en el modo de polaridad iónica positiva es de -10V y para el modo de polaridad iónica negativa es de 10V para el equipo LCQ Advantage Max (Thermo Electron Corporation, 2003).

**Figura 2-16:** Esquema de la disociación por colisión inducida (CID) en el analizador QIT para tándem en el tiempo. Modificada de (Hocart, 2010).



En eventos separados a) los iones que vienen de la fuente se acumulan y son atrapados en el espacio en el centro de los electrodos. b) los iones con una específica  $m/z$  son retenidos en la trampa y los demás son expulsados. c) los iones específicos colisionan debido a la excitación axial de los electrodos extremos para ser fragmentados y d) los iones productos resultantes son secuencialmente expulsados para generar el espectro de iones producto.

El número de iones que puede ser atrapados por QIT, o de hecho en cualquier instrumento de captura, está limitado por efectos de espacio carga. El espacio carga se produce cuando la nube de iones se hace lo suficientemente densa que la repulsión coulombica entre los iones cargados empieza a superar el potencial de captura, lo que resulta en una disminución en la exactitud y resolución de masas. Esta limitación de la IT entrega una baja resolución por la interferencia de reacciones secundarias debido a que todas las reacciones se producen en el mismo espacio, puede ser controlada si se limita el número de iones en la trampa en un momento dado (Ekman et al., 2009) (Hocart, 2010) (Picó et al., 2004).

El analizador de trampa de iones IT se considera como un analizador versátil y atractivo por sus características de sensibilidad y desempeño, especialmente por su capacidad de realizar análisis  $MS^n$  y su alta sensibilidad en modo de barrido (scan). Esta sensibilidad atribuible se deduce porque la eficacia en el proceso de colección de iones es mayor que el obtenido en un sistema de barrido (Ekman et al., 2009)(Picó et al., 2004).

La IT puede alcanzar múltiples estados del MS que aumenta en gran medida la información que se obtiene de una molécula, incluso la capacidad de almacenar iones positivos y negativos por extendidos periodos de tiempo hacen de la trampa de iones un analizador ampliamente utilizado para el análisis de plaguicidas. Ciertamente como la fragmentación de los iones separados en la trampa de iones depende de la frecuencia del voltaje de excitación resonante, de la magnitud de la RF y de la duración y permanencia del voltaje de excitación RF, varios autores han aplicado el analizador IT en modo tándem para el estudio de la fragmentación de los plaguicidas con típicos ejemplos de fragmentación positiva y negativa (Picó et al., 2004).

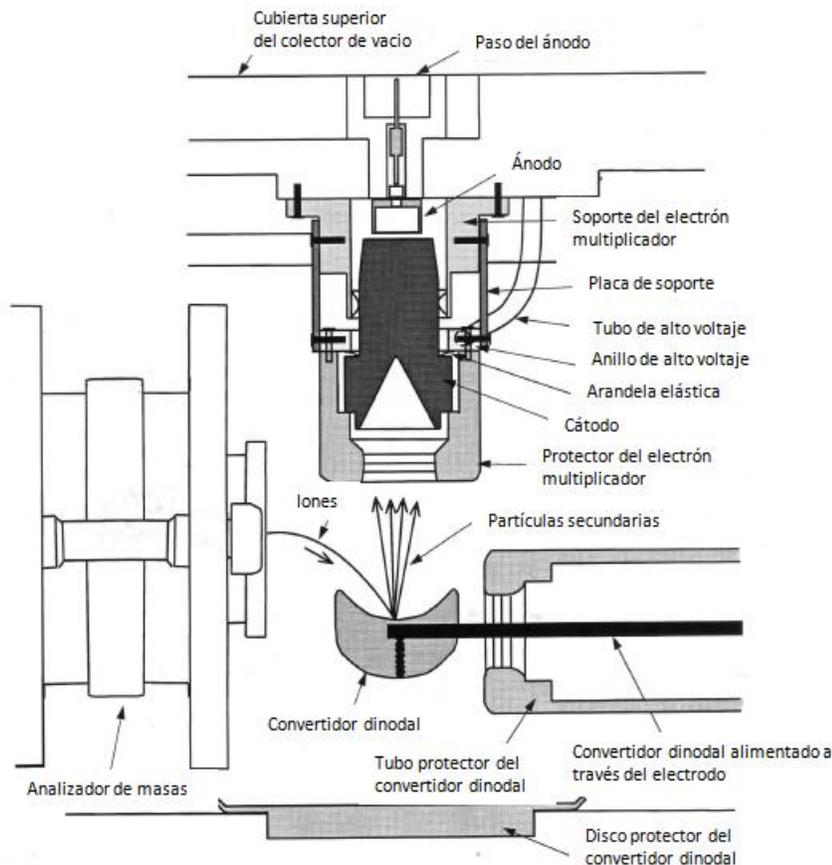
## ▪ **Detector**

Los iones pasan a través del analizador de masas y son transformados en una señal utilizable por un detector. Los detectores son capaces de generar a partir de los iones incidentes una corriente eléctrica que es proporcional a su abundancia (Ekman et al., 2009). El equipo LCQ Advantage Max tiene un sistema de detección de iones compuesto por un electrodo llamado dinodo de conversión a un potencial de 15 kV y un electromultiplicador (Figura 2-17).

Los iones desde el analizador son acelerados a una alta velocidad con el fin de mejorar la eficiencia de la detección. Esto se consigue mediante la presencia del dinodo de conversión con un potencial aplicado de -15kV para la detección de iones positivos o de 15kV para la detección de iones negativos. Cuando un ion positivo o negativo choca con el dinodo de conversión, una o más partículas secundarias se producen. Estas partículas secundarias pueden incluir iones positivos, iones negativos, electrones y partículas neutras. Cuando los iones positivos chocan con el dinodo de conversión cargado negativamente, las partículas secundarias de interés son iones negativos y electrones. Cuando los iones negativos chocan con el dinodo de conversión cargado positivamente,

las partículas secundarias de interés son iones positivos. Estas partículas secundarias son enfocadas por la superficie curva del dinodo de conversión y chocan con las paredes internas del cátodo del electromultiplicador con una energía suficiente para emitir electrones.

**Figura 2-17:** Corte transversal del sistema de detección de iones que muestra el electromultiplicador y el dinodo de conversión. (Thermo Electron Corporation, 2003).



Los electrones emitidos se aceleran más hacia el cátodo, producido por el gradiente de potencial cada vez más positivo. Los electrones emitidos no viajan lejos antes de que choquen con la superficie interior del cátodo de nuevo, lo que provoca la emisión de más electrones. Entonces, se crea un efecto de cascada de electrones que finalmente resulta en una corriente al final del cátodo donde los electrones son colectados por el ánodo. El número de partículas secundarias que chocan con el cátodo es proporcional a la corriente recogida por el ánodo (Thermo Electron Corporation, 2003).

Este sistema de detección amplifica la señal y disminuye el ruido. Además la orientación no lineal del sistema de detección con respecto al analizador de masas, hace que las moléculas neutras que vienen del analizador de masas tiendan a no chocar con el dinodo de conversión o el electromultiplicador. El resultado que se obtiene es una reducción en el nivel de ruido producido por estas (Thermo Electron Corporation, 2003).

## 2.8.4 Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

La espectrometría de masas en tándem, abreviado como (MS/MS) o  $MS^n$  es un modo de análisis de masas donde la información estructural de las moléculas de una muestra se obtiene mediante el uso de múltiples etapas de selección y separación de masas. En la primera etapa del MS, un ión se selecciona o aísla en el espectrómetro de masas, se activa y fragmenta comúnmente por el CID, y en la segunda etapa los iones producto son analizados en el MS. Dependiendo del instrumento utilizado, es posible llevar a cabo múltiples etapas de análisis de masas representados como ( $MS^n$ ), donde  $n$  es el número de etapas. De este modo, los iones que son producidos en la fuente de ionización y analizados por el analizador de masas se denominan iones precursores y los iones obtenidos de la fragmentación de estos se llaman iones productos. Estos patrones de fragmentación constituyen un ejercicio de elucidación estructural. Así mismo, es posible el uso de MS en tándem para añadir un alto grado de selectividad y mejorar la sensibilidad en un ensayo mediante la eliminación de ruido químico (Gross, 2011)(Hocart, 2010).

Este análisis dual de separación y análisis de masas se puede ejecutar ya sea en el espacio o en el tiempo. Si dos analizadores de masas están ubicados en serie generalmente separados por una celda de colisión, se trata de tándem en el espacio y los dos pasos son llevados a cabo al mismo tiempo pero en espacios separados; se logran con el analizador de triple cuadrupolo (TQ o QqQ) o con los sistemas híbridos de cuadrupolo con tiempo de vuelo (Q-TOF), tiempo de vuelo con tiempo de vuelo TOF/TOF entre otros desarrollos en instrumentación. Tándem en el tiempo se obtiene cuando la secuencia de los eventos se realizan en el mismo analizador pero en tiempos diferentes, es decir; los iones producidos en la fuente de iones son atrapados, aislados, fragmentados y separados por su relación  $m/z$  en el mismo dispositivo físico. Son alcanzados con los analizadores de cuadrupolo con trampa de iones (QIT). (Picó et al.,

2004) (Hocart, 2010) (Niessen & Group, 2006). La eficiencia experimental de esta disposición es generalmente más alta con respecto a los instrumentos de tándem en el espacio, puesto que los iones no tienen que ser transferidos entre los analizadores, sin embargo, los experimentos toman más tiempo en el monitoreo de los iones producto. Estos modos de trabajo en tándem proporcionan mayor sensibilidad que un LC/MS simple y ofrecen mayor información estructural de la molécula en estudio.

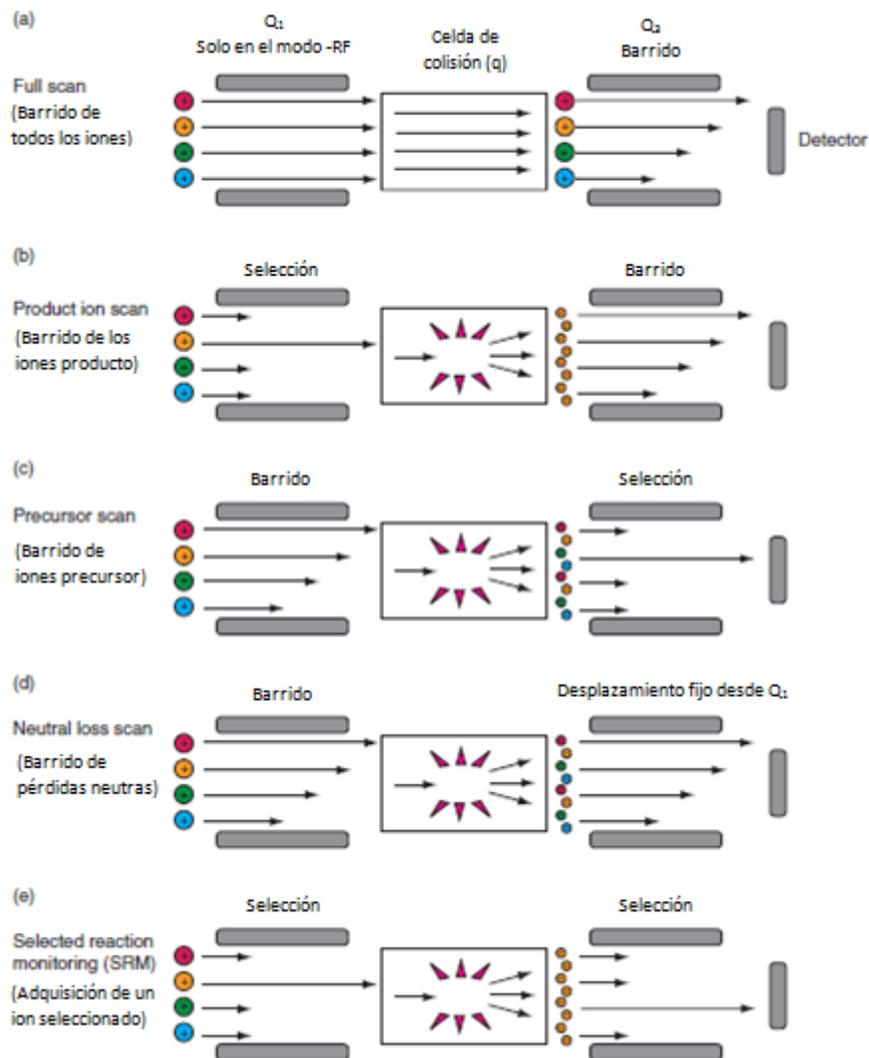
Existen diversos modos de adquisición cuando se utiliza espectrometría de masas en tándem MS/MS: Barrido de todos los iones (full scan), barrido de los iones producto (product ion scan), barrido de iones precursor (precursor ion scan), adquisición de la reacción monitoreada (Selected Reaction Monitoring, SRM), adquisición de un ión seleccionado (Single Ion Monitoring, SIM) y barrido de pérdidas neutras (Neutral Loss Scan)(Hocart, 2010) (Hoffmann & Stroobant, 2007)

#### ▪ **Barrido de todos los iones (full scan)**

Es el barrido que se realiza a todos los iones generados en la fuente de iones sin seleccionar una masa específica. Esto se hace mediante el análisis de la primera masa hasta la última sin interrupción por parte del analizador de masas de QIT. En un QqQ, tanto la celda de colisión (q) como el segundo cuadrupolo (Q2) no actúan en el proceso de selección, realizándose el barrido de iones con el primer cuadrupolo (Q1).

Este modo provee el espectro de masas completo de cada analito o el ion precursor. Proporciona mayor información acerca de un analito que la adquisición de la reacción monitoreada (SRM) o la adquisición de un ión seleccionado (SIM), pero el barrido de todos los iones no provee la sensibilidad que estos logran alcanzar (Figura 2-18) (Hocart, 2010)(Hoffmann & Stroobant, 2007).

**Figura 2-18:** Modos scan de un instrumento tándem en el espacio como un QqQ. Modificada de (Hocart, 2010).



### ▪ Barrido de los iones producto (product ion scan)

Barrido de los iones producto conlleva la selección de masa de un ión precursor en la primera etapa (Q1), la fragmentación (CID) en la celda de colisión y, a continuación el análisis de masas de todas las masas de los fragmentos resultantes (iones producto) en la segunda etapa del análisis de masas (Q3). Este experimento se puede realizar en instrumentos dotados con analizadores para realizar tándem en el espacio como el de sector magnético o tándem en el tiempo como la trampa de iones. Se realiza para

identificar transiciones que son utilizadas en cuantificación por MS en tándem o como parte de un ejercicio de elucidación estructural, puesto que se obtiene la máxima información posible del ion precursor (Hocart, 2010) (Hoffmann & Stroobant, 2007).

### ▪ **Barrido de iones precursor (precursor ion scan)**

En el barrido de iones precursor el primer analizador de masas (Q1) analiza todos los iones precursores y los enfoca a la celda de colisión para la fragmentación. El segundo analizador (Q3) transmite un único ion producto específico. El espectro de masas resultante es entonces un registro de todos los iones precursores que dan lugar al ion producto especificado. El barrido de ion precursor puede llevarse a cabo en equipos que realizan tándem en el espacio. La utilidad de este modo de análisis radica en el análisis de metabolitos de un compuesto específico o en el caso de un grupo de compuestos que se fragmentan en una estructura común (Hocart, 2010) (Hoffmann & Stroobant, 2007).

### ▪ **Adquisición de la reacción monitoreada (Selected Reaction Monitoring, SRM)**

Adquisición de la reacción monitoreada consiste en monitorear el ion precursor y el producto. En una ITQ ocurre en dos etapas, en la primera de ellas el analizador almacena los iones obtenidos de la fuente de iones y los correspondientes a una determinada relación de  $m/z$ , es decir; los iones precursores son seleccionados y los demás son expulsados del analizador de masas. Luego, los iones precursores son excitados tanto que colisionan con el gas presente en el analizador. Las colisiones de los iones precursores provocan su fragmentación en uno o más iones producto.

En la segunda etapa del análisis de masas, los iones producto son almacenados en el analizador de masas y entonces uno o más iones producto se seleccionan y los otros son expulsados del analizador. Finalmente, los iones seleccionados son secuencialmente barridos y enfocados fuera del analizador de masas para producir un espectro de reacción monitoreada. Con SRM se adiciona un considerable grado de selectividad debido al análisis de pares de iones (un ion producto por cada ion precursor). La sensibilidad en SRM también es mejorada de forma significativa, ya que mediante la eliminación del ruido químico de fondo, la relación de señal a ruido (S/N) del ion monitoreado es mejorada. SRM se puede realizar por equipos que trabajan en tándem en el espacio y tándem en el tiempo (Hocart, 2010) (Hoffmann & Stroobant, 2007).

### ▪ **Barrido de pérdidas neutras (Neutral Loss Scan)**

Barrido de pérdidas neutras es un modo de adquisición que utilizan los QqQ, el primer analizador de masas (Q1) monitorea todas las masas. El segundo analizador de masas (Q3) también analiza, pero a un desplazamiento fijo desde el primer analizador de masas. Esto corresponde a un desplazamiento de pérdidas neutras de masas que se observa normalmente en una clase particular de compuestos, por ejemplo la pérdida de 44 uma ( $\text{CO}_2$ ) de  $[\text{M-H}]^+$  será indicativo de ácidos carboxílicos. El espectro de masas es entonces un registro de todos iones precursores que pierden el fragmento neutro especificado. Los análisis de barrido de pérdidas neutras en equipos con analizadores QTOF no se realiza directamente sino por medio del análisis postacquisition que tiene el software para buscar la pérdida neutra especificada (Hocart, 2010). En el caso de QIT LCQ Advantage se denomina el experimento Data-Dependent y permite seleccionar y fragmentar solo algunos iones correspondientes a pérdidas específicas. Este modo de adquisición es útil para obtener información de la separación e identificación de compuestos de una mezcla compleja (Thermo Electron Corporation, 2003).

### ▪ **Adquisición de un ión seleccionado (Single Ion Monitoring, SIM)**

El SIM se realiza en una sola etapa, luego no se considera como un modo de adquisición de la espectrometría de masas en tándem MS/MS. En esta se monitorea un ion o grupo de iones. Cuando se utiliza ITQ los iones formados en la fuente de iones son almacenados en el analizador de masas, uno o más iones de una característica  $m/z$  son seleccionados y los demás iones son expulsados del analizador. En seguida, los iones seleccionados son secuencialmente enfocados hacia fuera del analizador de masas para producir un espectro de masas de ion seleccionado SIM. Puesto que, son pocos los iones monitoreados SIM proporciona bajos límites de detección y gran velocidad en comparación con un barrido completo. Los bajos límites de detección se explican porque permanece más tiempo monitoreando un ion específico y la mayor velocidad por los pocos iones de interés analizados. El espectro de masas del SIM es casi vacío y los iones que no son de interés no son monitoreados. Este experimento se utiliza para detectar pequeñas cantidades de un compuesto en una muestra, donde el espectro de masas del analito de análisis es conocido (Hocart, 2010) (Hoffmann & Stroobant, 2007).

## **2.8.5 Cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem LC-MS/MS para plaguicidas**

Debido a los diferentes grupos químicos y propiedades fisicoquímicas que tienen los plaguicidas, definir las mejores condiciones de análisis para la separación y detección se convierte en un reto analítico para el químico. La cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem LC-MS/MS se ha utilizado ampliamente para la determinación de plaguicidas en muestras ambientales y alimentos; y en menor frecuencia en muestras biológicas de interés en toxicología clínica y forense (Béla Kmellár, Pareja, Ferrer, Fodor, & Fernández-Alba, 2011) (Alder & Greulich, 2006) (B Kmellár et al., 2008) (Yinon, 2004) (Maurer, 2007)(Hernández et al., 2005) (Niessen & Group, 2006).

Los plaguicidas se pueden transformar en el ambiente, en las cosechas, en los animales y en el ser humano generando productos de degradación y metabolitos que son objeto de estudio toxicológico y por lo tanto de interés en el campo de la química analítica enfocados a desarrollar metodologías que permitan su monitoreo. En especial, porque los metabolitos de los plaguicidas frecuentemente provienen de procesos de degradación y metabolismo que aumentan su polaridad y solubilidad en medios acuosos (Hernández, Sancho, Ibáñez, & Grimalt, 2008), que deriva en el uso más adecuado de la LC/MS frente a la GC/MS para su determinación. Al respecto, los estudios realizados para el análisis de plaguicidas y sus metabolitos empleando LC/MS han satisfecho los requerimientos de sensibilidad y selectividad (Martínez Vidal, Plaza-Bolaños, Romero-González, & Garrido Frenich, 2009).

A nivel internacional algunos laboratorios han desarrollado metodologías analíticas que permiten determinar plaguicidas empleando cromatografía líquida con la variedad de interfaces de ionización especialmente: interfaces de presión Atmosférica APCI, Electrospray (ESI), haz de partículas (PB) y termospray (TSP). Estas interfases tienen una característica en común consistente en procesos de ionización suave que resultan en espectros de masas con pocos iones. En los últimos años se han preferido las fuentes de ionización a presión atmosférica en sus dos tipos ESI y APCI puesto que proporcionan aproximadamente en dos órdenes de magnitud más sensibilidad en comparación con la TSP para algunos plaguicidas (Ahmed, 2001)(Picó et al., 2004).

En cuanto a los analizadores utilizados para el análisis de plaguicidas se encuentran: triple cuadrupolo TQ, cuadrupolo trampa de iones QIT, trampa iónica lineal LIQ, tiempo de vuelo TOF, analizadores de sector magnético y los híbridos de analizadores. El más aplicado ha sido el triple cuadrupolo, seguido por la trampa de iones y el híbrido cuadrupolo con tiempo de vuelo. La desproporción en el número de aplicaciones se fundamenta en las ventajas y desventajas que suministra cada equipo en tándem. En concreto, la trampa de iones es considerado como un analizador relativamente económico dentro de los espectrómetros de masas con características de desempeño y sensibilidad muy llamativas para el análisis de plaguicidas, específicamente, por su capacidad de realizar experimentos  $MS^n$  y su alta sensibilidad en modo scan. Las limitaciones del analizador de trampa de iones básicamente se centra en cuantificaciones menos fiables para matrices complejas, situación tal que puede ser contrarrestada durante los procesos de validación para cada compuesto. En efecto, los analizadores de TQ, QIT y Q-TOF han demostrado por sí mismos ser aptos para generar espectros de masas exactos cuando otros instrumentos ofrecen una identificación no concluyente en el análisis de plaguicidas (Picó et al., 2004).

En resumen, aunque algunos plaguicidas pueden ser analizados por GC/MS o LC-MS/MS, los beneficios que brinda la LC-MS/MS en términos de mayor cobertura, incremento en la sensibilidad y selectividad además de lograr determinaciones sin derivatización, hacen de la técnica LC-MS/MS la opción más recomendable y óptima para el análisis de plaguicidas (Picó et al., 2004) (Alder & Greulich, 2006)(Niessen & Group, 2006).

## 2.9 Validación del método bioanalítico

La confiabilidad de los datos analíticos es un tema de gran importancia en Toxicología clínica y forense. Se considera como requisito para la correcta interpretación de resultados toxicológicos en el trabajo diario, así como en la evaluación de estudios científicos (Drummer, 2007). Datos analíticos de alta calidad son el producto de métodos confiables. Si los resultados obtenidos son dudosos o poco fiables a nivel de la toxicología clínica y forense pueden ser impugnados en las audiencias, llevar a falsas interpretaciones, subestimar o sobreestimar efectos, elegir un tratamiento erróneo para el

paciente y pueden generar consecuencias legales injustificadas para el acusado. (Peters et al., 2007).

Por esta razón, los nuevos métodos analíticos que serán utilizados en toxicología clínica y forense deben tener un cuidadoso desarrollo del método seguido por su validación, que respondan con los requerimientos de gestión de calidad y la acreditación de laboratorios. En este sentido, la validación del método analítico ha recibido considerable atención en la literatura, en los comités industriales, las agencias regulatorias, organizaciones internacionales y conferencias. (Rambla-Alegre, Esteve-Romero, & Carda-Broch, 2012) (Rozet, Marini, Ziemons, Boulanger, & Hubert, 2011) (Peters et al., 2007)(Blume et al., 2011) (EMEA/CHMP/EWP, 2011).

Se define la validación de un método analítico como el proceso de establecer las características de funcionamiento y las limitaciones de un método, además de identificar las influencias y en qué medida estas pueden cambiar las características definidas. El principal objetivo de la validación de un método analítico es asegurar que cada resultado futuro obtenido en un análisis de rutina, se encontrará lo suficientemente cerca al valor verdadero desconocido del analito en la muestra. En síntesis, permite evaluar la capacidad de un método desarrollado para generar resultados precisos con calidad y confiabilidad, así como la capacidad del personal que realiza el análisis y del laboratorio. La validación de un método se basa en parámetros que se evalúan estadísticamente, los procedimientos y el alcance de la validación son definidos individualmente. (Rambla-Alegre et al., 2012).

Si bien la validación de métodos analíticos ha sido estudiada y documentada como se ha mencionado, pocas son las guías direccionadas a los análisis de drogas, tóxicos y/o metabolitos en matrices biológicas complejas como fluidos y tejidos humanos. En efecto, una de las guías aceptadas y utilizadas por los farmacéuticos y la ciencia médica es la guía de validación de métodos de la ICH (Conferencia Internacional para la armonización de requerimientos técnicos para el registro de fármacos para uso humano) (ICH, 2005). Otras guías que explican con mayor detalle los parámetros para la validación de métodos bioanalíticos son la “Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation” de la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA) (FDA, 2001) y la más reciente “Guideline on Bioanalytical Method Validation” de la Agencia Médica Europea (EMA)

(EMEA/CHMP/EWP, 2011). Esta última guía, incluye nuevos parámetros de validación que han sido motivo de discusión en los últimos años como lo son: el efecto matriz, el efecto memoria “carry-over” y la integridad de la dilución (Nováková, 2012). Por otra parte, algunos artículos han tratado el tema de la validación de métodos orientados hacia fluidos biológicos y desde el punto de vista de la toxicología clínica y forense (Peters & Maurer, 2002) (Rozet et al., 2011)(Blume et al., 2011) (Peters et al., 2007). Estas fuentes de guías y artículos se utilizaron para el desarrollo del presente estudio.

Por consiguiente, para métodos bioanalíticos cuantitativos se ha llegado a un acuerdo que por lo menos los siguientes parámetros deben ser evaluados: selectividad, linealidad, estabilidad, exactitud, precisión (repetibilidad y precisión intermedia) y el límite inferior de cuantificación (LLOQ). Parámetros adicionales pueden incluirse como límite de detección (LOD), recuperación, reproducibilidad y robustez. En el caso de los métodos donde se emplea la técnica LC-MS se debe incluir dentro de la validación la evaluación del efecto matriz, en particular si la ionización empleada es electrospray (ESI) (Peters et al., 2007).

## 2.9.1 Parámetros de validación

### ▪ Selectividad

La selectividad es la capacidad del método bioanalítico para medir inequívocamente y diferenciar el analito(s) en la presencia de componentes, que se espera estén presentes. Típicamente, éstos podrían incluir metabolitos, impurezas, productos de degradación, componentes de la matriz o compuestos endógenos. (FDA, 2001). Este razonamiento sugiere que se tenga un muy buen conocimiento de la característica de la muestra y de su procedencia, para determinar si estos compuestos indeseados interfieren con el analito de interés e influyen la precisión del método. En este sentido, para los casos de toxicología clínica y forense es importante considerar aquellos medicamentos, drogas, tóxicos y/o metabolitos que potencialmente pueden ser interferentes. En definitiva aquellos xenobióticos que podrían estar presentes en muestras auténticas. (Peters et al., 2007).

Normalmente se ha establecido evaluar la selectividad en al menos seis fuentes individuales de matriz blanco, las cuales son analizadas y evaluadas para demostrar la ausencia de señales interferentes (EMEA/CHMP/EWP, 2011) (FDA, 2001).

### ▪ **Curva de calibración (Linealidad)**

Para los métodos de cuantificación es necesario evaluar la respuesta del instrumento (en métodos bioanalíticos es la razón de las áreas del analito y el estándar interno SI) con respecto a la concentración del analito, y debe ser evaluada en un rango de concentración específico. Esta función se caracteriza por el rango y la linealidad. (EMEA/CHMP/EWP, 2011)

En general, el acuerdo para métodos bioanalíticos consiste en que la curva de calibración debe ser preparada en la misma matriz de análisis, enriqueciendo la matriz con concentraciones conocidas del analito. La curva de calibración debe cubrir el rango de concentraciones definido por el límite inferior de cuantificación (LLOQ) y el límite superior de cuantificación (ULOQ). El requisito de las guías se encuentra entre un mínimo de cinco a ocho niveles de concentración (ICH, 2005)(FDA, 2001), la guía (EMEA/CHMP/EWP, 2011) especifica un mínimo de seis niveles de concentración, un blanco de matriz (matriz procesado sin analito y sin estándar interno) y una muestra cero (matriz procesada con estándar interno); analizados cada uno por duplicado.

Una vez corran los niveles de concentración con sus respectivas réplicas para el rango definido, se busca el modelo matemático que describe adecuadamente la relación entre la concentración del analito en las muestras y la respuesta. Uno de los modelos más usados es ajustar las curvas de calibración a un modelo lineal de regresión univariante  $Y = mx + b$ . Para este modelo, la variable independiente  $x$  es la concentración, la variable dependiente es la respuesta  $Y$ ,  $m$  es la pendiente de la ecuación y  $b$  el intercepto. Este modelo utiliza la regresión por mínimos cuadrados sin ponderar, aplicable para datos homocedásticos, por ejemplo si hay homogeneidad de las varianzas a través del rango de concentración. Esta situación se espera para datos con un orden de magnitud, sin embargo, muchos métodos en toxicología analítica cuentan con dos o tres órdenes de magnitud que se asocian con una significativa heterocedasticidad y por lo tanto, es necesario la transformación matemática de los datos o una ponderación del modelo de mínimos cuadrados. Los factores de la inversa de la concentración o la inversa del

cuadrado de la concentración  $1/x$  o  $1/x^2$  respectivamente, compensan de forma adecuada la heterocedasticidad. (Peters et al., 2007)(Almeida, Castel-Branco, & Falcão, 2002).

Si se encuentra que el modelo lineal explica el comportamiento de los datos, los parámetros de la curva de calibración se reportan, tales como la pendiente, el intercepto y se gráfica la relación de la concentración del analito con la respuesta. Para demostrar la tendencia lineal como tratamiento estadístico de los datos, se aplican las pruebas de hipótesis para la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación. El criterio de aceptación para el coeficiente de correlación en muchas aplicaciones en cromatografía es de 0,99, incluso pueden existir circunstancias en donde un mínimo de 0,98 en el coeficiente de correlación es aceptable (SOFT / AAFS Forensic Laboratory Guidelines, 2006). Los criterios de aceptación para el intercepto, la pendiente y el coeficiente de correlación se encuentran ilustrados en el anexo E.

#### ▪ Límite de detección LOD

Se define el límite de detección como la mínima concentración del analito en la muestra que puede detectarse en el método pero no necesariamente es cuantificable (ICH, 2005) o es la concentración mínima del analito en la muestra, que en el procedimiento bioanalítico puede distinguirse confiablemente del ruido de fondo (Peters & Maurer, 2002). El LOD se determina tradicionalmente en la concentración del analito donde la relación señal a ruido S/N sea igual o mayor a 3.

Sin embargo, en toxicología una identificación inequívoca del analito en la muestra requiere un criterio de aceptación más completo debido a las matrices biológicas complejas que se emplean. Específicamente en toxicología forense y control de doping, se ajusta más la definición del límite de detección como la concentración mínima del analito en la muestra en la cual los criterios de identificación específicos se cumplen (tiempo de retención, identificación de las transiciones características para cada analito) (Peters et al., 2007).

#### ▪ Límite inferior de cuantificación (LLOQ)

Es la mínima concentración de un analito en la muestra a la cual puede ser cuantitativamente determinado, con exactitud y precisión aceptables. Además su respuesta es por lo menos cinco veces la respuesta obtenida del blanco de matriz. El

LLOQ es el primer estándar de la curva de calibración (ICH, 2005)(EMEA/CHMP/EWP, 2011).

Existen diferentes modos de determinar el LLOQ, para mayor detalle (Peters et al., 2007). El método más práctico es la determinación de la concentración más baja del analito LLOQ basados en los cálculos de la precisión y exactitud. Para métodos bioanalíticos se considera que los criterios de aceptación de estos parámetros son de un coeficiente de variación (CV) menor o igual al 20% para la precisión y de  $\pm 20\%$  para la exactitud (FDA, 2001) (Peters et al., 2007)(EMEA/CHMP/EWP, 2011).

### ▪ Límite superior de cuantificación (ULOQ)

Es la máxima concentración del analito en la muestra que puede ser cuantificada con precisión y exactitud aceptables. En general, el ULOQ es igual al nivel máximo de concentración de la curva de calibración (Peters et al., 2007).

### ▪ Precisión

La precisión de un método analítico describe la cercanía de repetidas medidas individuales del analito (EMEA/CHMP/EWP, 2011). Es el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas obtenidas a partir de la toma múltiple de alícuotas de la misma muestra homogénea en condiciones preestablecidas a tres niveles de concentración bajo, medio y alto. Repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad (ICH, 2005).

La precisión de un procedimiento analítico se expresa como la varianza, ya sea como la desviación estándar relativa (RSD) o el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas (ICH, 2005).

### **Repetibilidad**

Expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un corto periodo de tiempo. También se le denomina como precisión intra-ensayo, precisión dentro del corrido o precisión dentro del día (Peters et al., 2007)(EMEA/CHMP/EWP, 2011) .

**Precisión intermedia**

Es la precisión que expresa las variaciones dentro del laboratorio, por ejemplo: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, diferentes reactivos etc. También se le denomina precisión inter-ensayo, precisión entre corridas o precisión entre días.(ICH, 2005)(FDA, 2001)(EMEA/CHMP/EWP, 2011).

**Reproducibilidad**

Expresa la precisión entre laboratorios (estudios colaborativos, usualmente aplicados a la estandarización de la metodología). Este parámetro se debe de realizar cuando el método será utilizado en otros laboratorios (ICH, 2005).

Para la determinación de la precisión se utiliza las muestras de control de calidad (QC) que son preparadas fortificando la matriz con el analito de estudio bajo las condiciones establecidas de análisis. De acuerdo con (Peters et al., 2007), idealmente los QC se deben obtener de fuentes diferentes en vez de una misma persona durante la validación, para eliminar los sesgos correspondientes a la pesada, dilución o alguna impureza de los estándares.

La precisión se debe demostrar para un mínimo de cinco muestras por nivel de concentración en LLOQ, dentro de tres veces el LLOQ (QC bajo), cerca del 50% del rango de la curva de calibración (QC medio) y al menos el 75% del valor más alto de la curva de calibración (QC alto) (EMEA/CHMP/EWP, 2011). El criterio de aceptación que se ha considerado para métodos bioanalíticos es de 15% de RSD o CV para los QC, excepto para el LLOQ que no puede exceder el 20% (Shah et al., 2000) (EMEA/CHMP/EWP, 2011)(FDA, 2001).

**▪ Exactitud**

La exactitud de un método analítico expresa la cercanía del valor determinado con respecto al valor verdadero convencional o el valor de referencia aceptado (EMEA/CHMP/EWP, 2011). Si bien es cierto que la exactitud es afectada por el error sistemático (sesgo) y por el error aleatorio (precisión), para efectos de la validación la exactitud se evalúa en términos del sesgo. Sesgo definido como la diferencia entre los resultados del análisis y el valor de referencia aceptado (Peters et al., 2007).

Así pues, la exactitud del método se expresa como el porcentaje de la desviación definido como  $(\text{valor determinado}/\text{valor verdadero}) \times 100\%$ . Se determina con el análisis de los QC frente a la curva de calibración y las concentraciones obtenidas se comparan con el valor nominal. La exactitud se evalúa para los QC intra-ensayo, dentro del corrido o dentro del día así como para los QC inter-ensayo, entre corridas o entre días (EMEA/CHMP/EWP, 2011).

La exactitud dentro del corrido se realiza con el análisis de un mínimo de cinco muestras por nivel, a un mínimo de cuatro niveles de concentración que cubran el rango de la curva de calibración: LLOQ y los QC bajo, medio y alto. Para la exactitud entre corridas se analiza el LLOQ, los QC bajo, medio y alto al menos tres corridas y al menos dos diferentes días (EMEA/CHMP/EWP, 2011). El criterio de aceptación para la exactitud en toxicología clínica y forense se encuentra en un sesgo dentro de  $\pm 15\%$  del valor de referencia aceptado y dentro de  $\pm 20\%$  cerca al LLOQ (Shah et al., 2000)(EMEA/CHMP/EWP, 2011)(FDA, 2001).

### ▪ Estabilidad

Se considera como la estabilidad química de un analito en una matriz dada bajo condiciones específicas e intervalos de tiempo definidos (Shah et al., 2000)(EMEA/CHMP/EWP, 2011). La estabilidad es un requisito importante de evaluación para asegurar la cuantificación del método, en especial si no existe información previa que argumente la estabilidad de cada uno de los analitos en estudio.

El abordaje del análisis de la estabilidad de acuerdo a la literatura incluye varios estadios en los que se encuentran (Rozet et al., 2011)(Blume et al., 2011)(Peters et al., 2007).

**Estabilidad a largo plazo:** Es la estabilidad del analito en la matriz bajo condiciones de almacenamiento en un periodo de tiempo, a las que se someten las muestras en estudio.

**Estabilidad a corto plazo:** Es la estabilidad del analito en la matriz a temperatura del laboratorio o a temperatura del procesamiento de la muestra.

**Estabilidad de la congelación y descongelación:** Como las muestras se congelan y descongelan para su análisis y reanálisis, entonces se evalúan tres ciclos de congelación y descongelación a dos concentraciones por triplicado.

**Estabilidad de las soluciones stock y las soluciones de trabajo del analito y el estándar interno:** sólo se analiza a una concentración determinada y no es necesario demostrar la estabilidad del estándar interno deuterado si ya se ha demostrado que no ocurren reacciones de intercambio bajo las mismas condiciones en que la estabilidad del analito se ha demostrado.

**Estabilidad del analito en las muestras procesadas:** Es la evaluación de la estabilidad de los analitos en las muestras preparadas bajo las condiciones de análisis como por ejemplo a las condiciones que se encuentra en el automuestreador y el tiempo que transcurre mientras se analiza en la programación de la secuencia en el automuestreador o el tiempo que transcurre en refrigeración antes de ser analizada.

Para determinar la estabilidad se evalúa por medio de los QC a dos concentraciones, una máximo tres veces el LLOQ y la otra cercana al ULOQ. Los QC son analizados utilizando la curva de calibración de estándares frescos y las concentraciones obtenidas son comparadas con las concentraciones nominales. El criterio de aceptación es dentro de  $\pm 15\%$  de la concentración nominal (EMEA/CHMP/EWP, 2011). Sin embargo, otros autores aceptan la complejidad de las matrices de carácter forense y se considera que los analitos son estables a las condiciones estudiadas si la media de los valores obtenidos para las muestras de estabilidad presenta un límite de confianza  $>80\%$  y  $<120\%$  con respecto a la media de los valores obtenidos para las muestras de comparación (Peters et al., 2007).

## ▪ Recuperación

La recuperación de un analito es la comparación entre la respuesta obtenida del detector después de haber adicionado y extraído el analito de la matriz biológica con la respuesta obtenida del detector para la concentración verdadera del estándar puro (FDA, 2001). Es posible calcularlo por la comparación de los resultados analíticos para las muestras extraídas a tres concentraciones (baja, media, y alta) con los estándares no extraídos que representan el 100% de la recuperación (FDA, 2001). La recuperación debe ser

reproducibile para cada concentración y algunas guías incluso definen que la especificación de la recuperación debe ser mayor al 50% (Peters et al., 2007).

Algunos autores consideran que no es necesario determinar la recuperación durante el proceso de validación si los parámetros de LLOQ, LOD, precisión y exactitud son aceptables (Shah et al., 2000)(Peters et al., 2007).

El efecto matriz (ME) afecta la estimación de la recuperación cuando se analiza con la técnica LC-MS, ya que el cambio en la respuesta de las muestras preparadas en comparación con la respuesta de la solución estándar; pueden ser atribuibles al efecto matriz en vez de la pérdida del analito durante el tratamiento de la muestra. Por lo tanto, es necesario evaluar si existe supresión o mejoramiento de la señal tanto para el analito como para el estándar interno. Peters y sus colaboradores recomiendan realizar los experimentos para la determinación de la recuperación en conjunto con los experimentos que evalúan la supresión y la optimización de la intensidad de los iones cuando se utiliza LC-MS/MS (Peters et al., 2007).

### ▪ **Robustez**

La robustez es la medida de la susceptibilidad de un método a pequeños cambios que podrían ocurrir durante la rutina de análisis como por ejemplo: pequeños cambios de pH, temperatura, composición de la fase móvil entre otros. La robustez puede ser útil en el proceso de desarrollo del método para detectar con anticipación los problemas que podrían presentarse en el transcurso de la validación (Peters et al., 2007). Sin embargo, no es necesario determinarla durante la validación a no ser que el método vaya a ser transferido a otro laboratorio (ICH, 2005)(Vander Heyden, Nijhuis, Smeyers-Verbeke, Vandeginste, & Massart, 2001).

### ▪ **Efecto matriz**

El efecto matriz es la alteración directa o indirecta, o interferencia en la respuesta debido a la presencia de analitos indeseados (para análisis), o otras sustancias de interferencia en la muestra (ICH, 2005). Esta alteración en la respuesta es atribuible al cambio en la eficiencia en el proceso de ionización y puede o bien incrementar la intensidad (aumento del ion) o reducir la intensidad (supresión del ion), lo cual resulta en una pobre exactitud, linealidad y precisión inter-/intra día del método. Aunque no se encuentran totalmente

entendidos los mecanismos moleculares por los cuales ocurren los efectos de matriz, se considera que se origina por la competencia entre los analitos y los compuestos que coeluyen sin detectarse y hacen parte de la matriz. Tales interacciones se llevan a cabo en solución o en fase gaseosa y se producen en la competencia de los componentes de la matriz no volátiles y los iones del analito por acceder a la superficie de la gota y en consecuencia transferirse a la fase gaseosa (Nováková, 2012)(Peters & Remane, 2012).

Trufelli y sus colaboradores (Trufelli et al., 2011) han enunciado los mecanismos más relevantes para el aumento /supresión de iones debido a la co-elución de compuestos en la fase líquida como sigue:

- Competencia del analito y los compuestos que co-eluyen por las cargas disponibles y acceden a la superficie de la gota.
- El cambio en la eficiencia de la formación y evaporación de la gota debido al incremento en la viscosidad y tensión superficial, provocada por la presencia de compuestos interferentes a alta concentración.
- La formación de partículas sólidas por inserción con aditivos no volátiles.
- La formación de pares iónicos entre el analito los compuestos que co-eluyen de la matriz o los aditivos que se encuentran presentes en la fase móvil.

Es notable que los métodos de análisis publicados en los últimos años que utilizan LC-MS/MS, están incluyendo la determinación del efecto matriz como parámetro en sus validaciones, sin embargo; poco se ha referido en el campo de la toxicología clínica y forense donde las matrices de análisis son complejas como lo son: el cabello, fluidos orales, sudor, meconio, sangre y muestras postmortem. En este ámbito Peters y colaboradores (Peters & Remane, 2012) consideran que es difícil evitar los fenómenos de efectos de matriz, aun cuando se emplean las técnicas más sofisticadas para la preparación de muestras; y no siempre resulta en la eliminación de tales efectos.

Generalmente el uso de estándares internos deuterados compensa de forma eficiente el efecto matriz en las cuantificaciones debido a una razón de áreas estable entre el analito de interés y el estándar interno deuterado cuando co-eluyen perfectamente, pero se debe tener cuidado porque no compensa el efecto de la disminución en la sensibilidad del método (Peters & Remane, 2012). Al respecto, la (SOFT / AAFS Forensic Laboratory

Guidelines, 2006) señala que el uso de compuestos deuterados como estándar interno puede ser la única manera de compensar la supresión de iones.

Por lo anterior, el estudio de los efectos de matriz es una parte importante en el desarrollo y validación de métodos utilizando LC-MS. La evaluación de los efectos de matriz se puede realizar por tres métodos: Infusión post-columna, adición post-extracción y por comparación de las pendientes de las curvas de calibración (Nováková, 2012). La determinación por medio de la adición post-extracción permite evaluar la magnitud y variabilidad de los efectos de matriz entre las muestras, siendo la preferida durante la validación, especialmente en los métodos cuantitativos (Peters & Remane, 2012).

Para la evaluación de los efectos de matriz por el método de la post-extracción, se utilizan seis lotes como mínimo de blancos de matriz de donadores individuales. Para cada analito y el estándar interno se calcula el factor de matriz (MF) por el cálculo de la razón de áreas de pico en presencia de la matriz (medidas después de la extracción de la matriz blanco fortificado con el analito) con el área de pico del analito en ausencia de matriz (sistema). El MF del estándar interno normalizado se calcula dividiendo el MF del analito por el MF del SI. El criterio de aceptación depende de la guía utilizada, un CV del MF de SI normalizado no mayor al 15% (EMEA/CHMP/EWP, 2011). La determinación se debe realizar a niveles de concentración alto y bajo es decir; máximo tres veces el LLOQ y cerca al ULOQ (EMEA/CHMP/EWP, 2011).

### ▪ Efecto memoria

Los efectos memoria “carry over” se considera un problema de los inyectores automáticos que afecta la secuencia de las inyecciones de los estándares en la calibración, impide que se hagan de manera aleatoria y por lo tanto usualmente se hacen de menor a mayor. Es un parámetro nuevo que se debe evaluar durante el desarrollo y validación del método. Se lleva a cabo por la inyección de muestras blancos después de una muestra de alta concentración o un estándar de calibración por encima de ULOQ. El criterio de aceptación para la muestra blanco después de la muestra de alta concentración no debe ser mayor que el 20% del límite de cuantificación y 5% del estándar interno. Si el efecto memoria es inevitable, entonces el análisis de las muestras no debe ser aleatorio y se debe considerar algunas medidas para que no afecte el

análisis de las muestras, como por ejemplo inyectar muestras blanco después de las muestras a las cuales se espera una alta concentración (EMEA/CHMP/EWP, 2011).

### ▪ Intensidad relativa de los iones

Los diferentes analizadores de masas y los diversos modos de adquisición proporcionan diferentes grados de selectividad y confianza en la identificación. La guía SANCO para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos, define los requerimientos para la identificación y diagnóstico de un plaguicida de acuerdo al analizador de masas utilizado y al modo de adquisición (SANCO/12495/2011, 2011). Además menciona las tolerancias de la intensidad relativa de los iones como criterio de identificación, adicionalmente a los ya conocidos de tiempo de retención y a los fragmentos de m/z (en tándem MS/MS corresponden a las transiciones). La intensidad relativa de los iones detectados se expresa como el porcentaje de la intensidad del ion más abundante o de la transición de los niveles de calibración en concentraciones comparables, que se miden bajo las mismas condiciones de análisis. En la tabla 2-5 y 2-6 se encuentran los criterios de identificación que se aplican de acuerdo al instrumento utilizado en el presente estudio y las tolerancias permitidas de la intensidad relativa de iones cuando se utiliza espectrometría de masas.

**Tabla 2-5:** Requerimientos de identificación para diferentes tipos de espectrómetros de masas. Modificada de (SANCO/12495/2011, 2011).

| Modo MS                            | Simple MS (resolución estándar de masas)  | MS/MS  |
|------------------------------------|---|--|
| Sistema típico (ejemplos)          | Cuadrapolo, trampa de iones, tiempo de vuelo (TOF)  | Triple cuadrapolo trampa de iones, híbridos MS (por ejemplo Q-TOF, Q-trap)                           |
| Adquisición                        | Barrido completo (full scan), rango limitado de m/z<br>Adquisición de un ión seleccionado (SIM) | Seleccionado/monitoreo de reacción múltiple (SRM/MRM), espectro de barrido completo de ion producto. |
| Requerimientos para identificación | ≥ 3 iones producto de diagnóstico (preferiblemente incluyendo el pseudo ion molecular)          | ≥ 2 iones producto   |

**Tabla 2-6:** Tolerancias máximas permitidas y recomendadas para la intensidad iónica relativa, usadas en un rango de técnicas espectrométricas. Modificada de (SANCO/12495/2011, 2011).

| <b>Intensidad Relativa<br/>(% de pico base)</b> | <b>CI-GC-MS, GC-MS<sup>n</sup>, LC-MS, LC-MS<sup>n</sup><br/>(relativo)</b> |
|---|---|
| > 50%   | ± 20%   |
| > 20 % a 50 %                                   | ± 25%   |
| > 10% a 20 %                                    | ± 30%   |
| ≤ 10 %  | ± 50%   |

La guía para laboratorios forenses de la SOFT / AAFS recomienda igualmente el empleo de dos iones producto para la identificación de un compuesto cuando se utiliza espectrometría de masas (SOFT / AAFS Forensic Laboratory Guidelines, 2006).

## **3. Metodología**

Este estudio es de tipo experimental de corte transversal, con el fin de identificar y cuantificar aldicarb, carbofurano y metamidofos en muestras de sangre de casos forenses cuya intoxicación aguda y muerte fue generada por alguno de estos plaguicidas.

### **3.1 Área geográfica y población de estudio**

La metodología bioanalítica desarrollada y validada fue aplicada para identificar y cuantificar aldicarb, carbofurano y metamidofos en muestras de sangre de occisos provenientes de la ciudad de Bogotá y los departamentos de Cundinamarca y Boyacá que llegan al Laboratorio de Toxicología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la ciudad de Bogotá, asociados con intoxicación aguda con los plaguicidas en estudio durante el último trimestre del 2012.

### **3.2 Recolección de datos**

Las fuentes primarias de los datos de los casos son los informes periciales de necropsia y la solicitud de análisis que llega al Laboratorio de Toxicología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la ciudad de Bogotá. Los datos son recolectados y el procesamiento de la información se realiza por medio del programa Excel 2007.

### **3.3 Criterios de inclusión**

Los casos forenses provenientes de la ciudad de Bogotá y los departamentos de Cundinamarca y Boyacá del último trimestre del 2012 en donde se especifique posible intoxicación con alguno de los plaguicidas en estudio y/o el análisis rutinario por GC/MS desarrollado por el perito forense a la matriz de contenido gástrico haya resultado como positivo para el aldicarb, metamidofos o carbofurano. Además se debe contar con una cantidad mínima de 1 mL de muestra de sangre tomada de vaso periférico y colectada en

tubo vacutainer de 7 mL tapa gris, almacenada desde la toma de la muestra a una temperatura de 4 a 5 °C. El tubo tapa gris tiene fluoruro de sodio como conservante y oxalato de potasio como anticoagulante por convención internacional.

### **3.4 Unidad de análisis**

La unidad de análisis es cada tubo de ensayo con un mínimo de 1 mL de muestra de sangre.

Para el desarrollo y validación de la metodología bioanalítica la sangre empleada fue obtenida del banco de sangre de la Cruz Roja. El requerimiento fundamental para esta sangre es asegurar la ausencia de los plaguicidas en estudio. Para este efecto, se hizo necesario analizar un blanco de matriz y se verificó por medio de la respuesta cromatográfica y la espectrometría de masas la ausencia de aldicarb, metamidofos y carbofurano. Todas las unidades de análisis fueron almacenadas hasta su análisis a una temperatura de 4 a 5 °C.

### **3.5 Metodología analítica**

#### **3.5.1 Equipos, materiales y reactivos**

##### **▪ Equipos**

- Equipo de cromatografía líquida con espectrometría de masas LC-MS Marca Thermo Electron Corporation, Modelo Thermo SURVEYOR – LCQ ADVANTAGE MAX.
- Generador de Nitrógeno, marca PEAK SCIENTIFIC modelo NM30LA.
- Balanza analítica Mettler Toledo (División de escala 0,0001 g).

##### **▪ Reactivos**

- Acetonitrilo grado reactivo
- Acido Fórmico grado reactivo
- Formiato de amonio 99%.
- Metanol grado HPLC Merck.
- Agua desionizada.

**Tabla 3-7:** Estándares utilizados.

| Sustancia  | Proveedor                            | Presentación    | Pureza (concentración) |
|--|--------------------------------------|-----------------|------------------------|
| Aldicarb   | Dr Ehrenstorfer GmbH                 | Sólido          | 99,5 %                 |
| Carbofuran   | Dr Ehrenstorfer GmbH                 | Sólido          | 98,5%                  |
| Metamidofos  | Dr Ehrenstorfer GmbH                 | Sólido          | 98,5%                  |
| Aldicarb – d <sub>3</sub> (metil)                                      | Dr Ehrenstorfer GmbH                 | Líquido 1.1 mL  | 100 ng/μL en acetona   |
| Carbofuran – d <sub>3</sub> (N-metil)                                  | Dr Ehrenstorfer GmbH                 | Líquido 1.1 mL  | 100 ng/μL en acetona   |
| Metamidofos – d <sub>6</sub> (Dimetil)                                 | Dr Ehrenstorfer GmbH                 | Líquido 1.1 mL  | 100 ng/μL en acetona   |
| Cafeína  | Sigma - Aldrich                      | Líquido 1.1 mL  | 1 mg/mL en metanol     |
| Ultramark 1621   | Alfa Aesar A Johnson Matthey Company | Líquido viscoso | 95,0%                  |
| MRFA (L-metionil-arginil-fenilalanil-alanina acetato-H <sub>2</sub> O) | Research plus Inc.                   | Sólido          | 98,5%                  |

### ▪ Material de laboratorio

- Rapivad Evaporation System Labconco.
- Centrifuga Fisher Scientific.
- Agitador Vortex
- Cabina de extracción
- Micropipeta 10 μL -100 μL y micropipeta 100 μL -1000 μL .
- Sistema de filtración.
- Membranas, tamaño de poro 0,22 μm
- Columna HPLC Hypersil Gold PFP (Pentafluorofenil) de (50 mm X 2,1 mm, 5 μm) 250 psi.
- Viales de 1,5 mL con insertos adaptables a los viales.
- Gradillas para tubos de ensayo y tubos de ensayo de vidrio 6 mL.
- Balones aforados de 10 mL, 20 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL y 1000 mL.
- Viales de 10 mL.
- Grafadora y desgrafadora.

### ▪ Preparación de la solución stock o madre

Se preparó una solución stock de 1,0 mg/mL en metanol HPLC de cada plaguicida de interés aldicarb, metamidofos y carbofuran de la siguiente manera:

**Tabla 3-8:** Preparación de las soluciones madre de cada plaguicida.

| Sustancia   | PM (g/mol) | Cantidad pesada (mg) | Pureza (%) | Concentración final (mg/mL) |
|-------------|------------|----------------------|------------|-----------------------------|
| Aldicarb    | 190,27     | 10,0479              | 99,5%      | 1,00                        |
| Carbofuran  | 221,22     | 10,1520              | 98,5%      | 1,02                        |
| Metamidofos | 141,10     | 10,1523              | 98,5%      | 1,02                        |

### ▪ Preparación de las soluciones de trabajo

**Solución Mix de los analitos de trabajo 5,0 µg/mL:** A partir de la solución stock de cada plaguicida, se preparó la solución de trabajo diluyendo hasta obtener una concentración de 5,0 µg/mL. Para ello se tomó 1,0 mL de cada solución stock de 1,00 mg/mL y se llevó a un balón aforado de 200 mL con metanol grado HPLC.

**Solución Mix de los estándares internos deuterados de 5,0 µg/mL:** Se preparó una solución de 5,0 µg/mL, por dilución de 1 mL de la solución inicial de referencia (100 ng/µL) de cada uno de los plaguicidas deuterados (aldicarb-d<sub>3</sub>, carbofuran-d<sub>3</sub>, metamidofos-d<sub>6</sub>) y completando a volumen en un balón aforado de 20 mL con metanol grado HPLC.

### ▪ Preparación de reactivos

**Solución para reconstituir las muestras metanol-agua (1:1 v:v) con 0,1 % de ácido fórmico:** En un balón de 100 mL, se midió 50 mL de metanol grado HPLC, se adicionó 100 µL de ácido fórmico y se llevó a volumen con agua desionizada.

**Fase móvil:** Compuesta por dos soluciones una acuosa y otra orgánica.

**Solución acuosa:** Para un 1 L, se disuelve 0,63 gramos de formiato de amonio en agua desionizada, se adicionó 1,0 mL de ácido fórmico. Se llevó a volumen con agua desionizada y se filtra la solución al vacío en membrana tamaño de poro de 0,22 µm.

**Solución orgánica:** Para un 1 L, se adiciona 1,0 mL de ácido fórmico y se completa a volumen con metanol grado HPLC. Se filtra la solución al vacío en membrana tamaño de poro de 0,22 µm.

### Preparación de la Muestra

En la tabla 3-9 se describe el protocolo para la preparación de las muestras de sangre de los casos y la sangre fortificada para la validación (método).

**Tabla 3-9:** Procedimiento de análisis de muestra.

| Etapas                     | Procedimiento  |
|----------------------------|--|
| Preparación                | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. En tubos de ensayo de 6 mL adicionar 1 mL de sangre.</li> <li>2. Adicionar 50 <math>\mu</math>L de la solución de estándar interno de 5,0 <math>\mu</math>g/mL.</li> <li>3. Agitar en el vortex.</li> </ol>  |
| Precipitación de proteínas | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Lentamente adicionar gota a gota 1 mL de Acetonitrilo frio (temperatura de 0 °C) mientras agita en el vortex. Es esencial no suspender la agitación.</li> <li>2. Agitar 30 segundos adicionales en el vortex.</li> <li>3. Tapar los tubos.</li> <li>4. Colocar los tubos a 0 °C por 30 minutos para facilitar la separación.</li> <li>5. Centrifugar a aproximadamente 2.000 rpm.</li> <li>6. Transferir la capa superior orgánica a tubos de ensayo de 6 mL limpios y secos, con cuidado de no transferir la capa inferior.</li> <li>7. Evaporar en evaporador concentrador (Rapivad) a 45 °C con agitación, hasta volumen aproximado de 0,5 mL y aplicar vacío máximo hasta sequedad.</li> </ol> |
| Reconstitución             | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Reconstituir con 100 <math>\mu</math>L de solución para reconstituir muestras.</li> <li>2. Agitar en el vortex a máxima velocidad durante 10 segundos. Dejar reposar por 5 minutos.</li> <li>3. Trasvasar el reconstituido al inserto y marcar el vial.</li> </ol> <p data-bbox="573 1528 1412 1612">Nota: Si en el paso 2 se encuentra un reconstituido con residuos sólidos, tomar el sobrenadante con la pipeta.</p>  |
| Análisis                   | Muestra lista para análisis por el LC/MS.  |

Para eliminar el efecto del solvente, los estándares de calibración se secaron a 45 °C en el rapivap antes de adicionar la sangre blanco. Se adiciona 1 mL de sangre blanco a cada tubo.

Una vez la muestra de sangre de los casos forenses se sometió al tratamiento mencionado, se analizó por el LC/MS por duplicado.

### 3.5.2 Optimización del sistema instrumental

Para optimizar la adquisición de datos del MS, es necesario realizar los siguientes tres pasos de calibración y ajuste “tune”.

1) En primera instancia, se realizó el tune del detector MS en modo ESI por la infusión directa de la solución de calibración del equipo. Este paso se efectúa para establecer un flujo continuo de los iones dentro del detector MS y demostrar que la transmisión de los iones hacia el detector es óptima. Se introduce a través de la jeringa de infusión la solución de calibración compuesta por cafeína, ultramark 1621 y MRFA a un flujo de 5,0  $\mu\text{L}/\text{min}$  por un minuto. Se elige la relación  $m/z$  195 de la cafeína de la solución de calibración y se observa su espectro de respuesta con una variabilidad de scan a scan menor al 15%.

2) Luego se realizó la calibración del MS en modo ESI con la solución de calibración (cafeína, ultramark 1621 y MRFA) en forma automática para optimizar su desempeño. Con este proceso de calibración se optimiza el proceso de separación y fragmentación de los iones para determinar su razón de  $m/z$ . El equipo después de realizar la calibración presenta un resumen de los parámetros de calibración obtenidos satisfactoriamente y se detiene si existe alguna inconsistencia.

3) Por último, para maximizar la detección de los plaguicidas en estudio, se optimizó la respuesta del detector MS por medio del tune de uno de los estándares internos deuterados, en este caso el aldicarb- $\text{d}_3$  en modo ESI positivo. Este tune se guarda en el equipo y se toma de referencia para el método de análisis.

Dentro de los parámetros que se optimizan en la calibración y tune son: temperatura del capilar, flujo del gas de arrastre y auxiliar (nitrógeno), mencionados en la descripción del MS.

La idoneidad del sistema cromatográfico se desarrolló mediante la evaluación de los parámetros de repetibilidad del flujo de la bomba, repetibilidad y linealidad del inyector, los test de temperatura del horno y de temperatura de la bandeja de muestras; y el efecto memoria de la inyección que se realiza dentro de la calificación del equipo de cromatografía líquida con espectrometría de masas LC-MS marca Thermo Electron Corporation, modelo Thermo Surveyor – LCQ Advantage Max el día 29 de marzo del 2012 por Innovatek Ltda. El informe de calificación se encuentra disponible en el Laboratorio de Toxicología – Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses – Regional Bogotá.

### 3.5.3 Condiciones cromatográficas

- La cromatografía líquida se llevó a cabo en una columna HPLC Thermo Scientific Hypersil Gold PFP (50 mm X 2,1 mm ID, 5  $\mu$ m) 250 psi, protegida con una precolumna Hypersil Gold PFP de (10 mm x 4 mm ID, 5  $\mu$ m).
- Temperatura del rack donde se encuentran las muestras: 10 °C
- Temperatura del horno donde se encuentra la columna: 40 °C
- Fase móvil: Los solventes de la fase móvil fueron las soluciones A y C, programados en la tabla 3-10.  
A: Fase acuosa: compuesta por una solución de formiato de amonio de 10 mM con ácido fórmico 0,1%.  
C: Fase orgánica: compuesta por metanol grado HPLC con ácido fórmico al 0,1%.
- Volumen de inyección: 10  $\mu$ L.
- Después de cada inyección se programaron ciclos de lavado y purga del sistema de inyección con metanol – agua en una proporción 1:1 de 2000  $\mu$ L y velocidad de lavado de 100  $\mu$ L/s.

**Tabla 3-10:** Programación del gradiente de elución de la fase móvil.

| No | Tiempo (min.) | A% | C % | Flujo ( $\mu$ l/min) |
|----|---------------|----|-----|----------------------|
| 0  | 0,0           | 98 | 2   | 200                  |
| 1  | 1,0           | 98 | 2   | 200                  |
| 2  | 9,0           | 2  | 98  | 200                  |
| 3  | 13,0          | 2  | 98  | 200                  |
| 4  | 14,0          | 98 | 2   | 200                  |
| 5  | 16,0          | 98 | 2   | 200                  |

### 3.5.4 Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

- Interfase de ionización electrospray ESI modo positivo.
- La energía de colisión y el ancho de aislamiento “isolation width” fue optimizado para cada plaguicida por separado y su estándar interno deuterado.
- Analizador de trampa de iones en tándem mediante barrido de los iones producto (product ion scan)

### 3.5.5 Validación del método bioanalítico

La metodología analítica se desarrolló y validó de acuerdo a los parámetros recomendados por la guía publicada por la Agencia Médica Europea (EMA) (EMA/CHMP/EWP, 2011) y las consideraciones de los nuevos métodos analíticos para ser usados en toxicología clínica y forense sugeridas por Peters y colaboradores (Peters et al., 2007) y la guía para laboratorio de toxicología forense de la Sociedad de Toxicólogos Forenses y la Academia Americana de Ciencias Forenses (SOFT / AAFS Forensic Laboratory Guidelines, 2006): selectividad, modelo de calibración (linealidad), estabilidad, exactitud, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), límite de cuantificación (LLOQ), límite de detección (LOD), recuperación, efecto memoria y efecto matriz (ME). Estos parámetros de validación se evaluaron en la metodología analítica para la determinación y cuantificación de aldicarb, carbofurano y metamidofos en muestras de sangre.

Cuando los analitos se trabajan en metanol y no son sometidos a ningún procedimiento de preparación de muestra se denomina el Sistema. Cuando la matriz sangre se fortifica con los analitos y son sometidos al procedimiento de análisis de muestra se denomina el Método.

#### ▪ Selectividad

La selectividad de la metodología fue evaluada con doce fuentes diferentes de sangre blanco provenientes de seis occisos quienes la causa de muerte no se encuentra relacionada con intoxicación por plaguicidas y seis donantes, cantidades elegidas de acuerdo a la guía de validación de métodos bioanalíticos (EMA/CHMP/EWP, 2011). Las

doce muestras fueron individualmente analizadas para verificar que los compuestos endógenos de las matrices no presentan señal interferente en el tiempo de retención y con las transiciones características para cada compuesto. Para llevar a cabo este análisis, previamente se determina el tiempo de retención, el ion precursor y los iones producto específicos para el aldicarb, carbofurano y metamidofos.

Debido a la presencia de drogas, metabolitos y medicamentos en casos de toxicología forense, es importante evaluar las posibles interferencias con estos xenobióticos. Para ello, se evalúa la selectividad empleando muestras blancos de sangre fortificadas con los siguientes analitos: oxazepam, nordiazepam, lorazepam, 7-aminoflunitrazepam, 7-aminoclonazepam, diazepam, midazolam, alfahidroximidazolam, alprazolam, nitrazepam, temazepam, flunitrazepam, bromazepam, triazolam, hidroxitriazolam, clonazepam, escopolamina, clorpromazina, levomepromazina, tioridazina, trifluoperazina, amitriptilina, nortriptilina, imipramina, desipramina, zolpidem, trazodona, cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina, morfina, codeína y 6-acetilmorfina; a una concentración de 0,10 µg/mL cada uno y se analiza las posibles interferencias con el aldicarb, carbofurano, metamidofos y los estándares internos deuterados aldicarb-d<sub>3</sub>, carbofurano-d<sub>3</sub> y metamidofos-d<sub>6</sub>.

La ausencia de interferencias causada por los estándares internos isotópicamente marcados se valoró con blancos de sangre con estándar interno cada vez que se preparaba una curva de calibración.

### ▪ Linealidad y rango

El rango lineal del método fue establecido de acuerdo a las concentraciones encontradas de cada uno de los plaguicidas en sangre para casos toxicológicos forenses que se reportan en la literatura y la capacidad del analizador de trampa de iones (Moffat & Osselton, 2011). En el presente estudio el rango del método analítico se definió entre 0,10 a 5,0 µg/mL, que comienza con la concentración del límite de cuantificación LLOQ y seis concentraciones por encima de esta.

### Sistema

La curva de calibración fue preparada con los siguientes siete niveles de concentración 0,10, 0,25, 0,50, 0,75, 1,0, 2,5 y 5,0 µg/mL, cada nivel con cinco réplicas desde la

preparación para cada uno de los plaguicidas aldicarb, carbofurano y metamidofos. El estándar interno empleado para la cuantificación de cada plaguicida es su respectivo analito deuterado, de este modo se tiene el aldicarb- $d_3$ , carbofuran- $d_3$  y metamidofos- $d_6$  a una concentración de 0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  cada uno. Los blancos con estándar interno y sin estándar interno se incluyeron en cada corrido.

Puesto que el sistema presenta el mismo procedimiento analítico que el método pero sin la matriz sangre, cada nivel de concentración en el tubo se seca a 45 °C y se reconstituye con los 100  $\mu\text{L}$  de la solución de reconstitución.

### **Método**

La curva de calibración del método se preparó a los mismos siete niveles de concentración y cinco réplicas desde la preparación tomando alícuotas de 20, 50, 100, 150, 200, 500 y 1000  $\mu\text{L}$  de la solución mix de los analitos de trabajo 5,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en cada tubo respectivamente y 50  $\mu\text{L}$  de la solución mix de los estándares internos deuterados de 5,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para eliminar el efecto del solvente cada nivel de concentración en el tubo se seca a 45 °C antes de adicionar la matriz de sangre. Luego se adiciona 1 mL de sangre blanco a cada tubo y se somete al procedimiento de análisis de la muestra. Los blancos de matriz con estándar interno y sin estándar interno se incluyeron en cada corrido.

La preparación de la curva de calibración se llevó a cabo tanto para el día uno como para el día dos.

### **▪ Límite de detección (LOD)**

Para determinar la mínima concentración de plaguicida que el método puede detectar e identificar, se fortifica con el aldicarb, carbofurano y metamidofos la matriz de sangre en el orden de 5, 10, 20, 50, 80 y 100  $\text{ng}/\text{mL}$ . Se realiza el procedimiento de análisis de la muestra y de los corridos cromatográficos. Aquella concentración mínima de plaguicida donde el pico cromatográfico presentó una relación señal a ruido (S/N) mayor a 3 y en su correspondiente espectro de masas se identificó las dos transiciones monitoreadas (ion precursor e iones producto) es el límite de detección (Peters et al., 2007). Se analizaron cinco réplicas. Para el sistema se realizó el mismo procedimiento.

### ▪ Límite inferior de cuantificación (LLOQ)

Se considera la mínima concentración de cada uno de los plaguicidas en estudio que cumpla con los criterios de precisión  $CV \leq 20\%$  y la concentración media calculada dentro del  $\pm 20\%$  del valor nominal. Para determinar el LLOQ se analizan cinco réplicas desde la preparación en el nivel de concentración que cumpla con los criterios de aceptación para métodos bioanalíticos. El LLOQ calculado de esta manera será considerado el primer nivel de la curva de calibración.

### ▪ Límite superior de cuantificación (ULOQ)

El ULOQ es igual al nivel máximo de concentración de la curva de calibración, se determina su precisión y exactitud con cinco réplicas para cada plaguicida en estudio. Con un criterio de aceptación de  $CV \leq 15\%$  para la precisión y la concentración calculada dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal para la exactitud.

### ▪ Precisión

#### Repetibilidad

La repetibilidad fue evaluada a cuatro niveles de concentración de la curva de calibración: LLOQ, concentración baja, media y alta (0,10, 0,25, 2,5  $\mu\text{g/mL}$  y 5,0  $\mu\text{g/mL}$ ) con cinco muestras por nivel el mismo día por el mismo analista, tanto en el sistema como en el método.

#### Precisión intermedia

Para la evaluación de la precisión intermedia se emplearon cuatro niveles de concentración de la curva de calibración (LLOQ, concentración baja, media y alta) con cinco muestras por nivel, se analizaron el mismo día por dos analistas y por el mismo analista durante dos días para el sistema y el método. De las cinco lecturas obtenidas por cada nivel de concentración se determina la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Con el propósito de determinar si hay diferencia significativa entre los días y entre los analistas, se realizó el análisis estadístico de perfiles para medidas repetidas en el que se consideran las cinco réplicas y no sólo los cuatro niveles de concentración mencionados sino que se amplió en todo el rango dinámico de la curva de calibración

(los siete niveles de concentración). Para facilitar este estudio estadístico, se supusieron tres grupos: analista uno en el día uno (tratamiento 1), analista dos en el día uno (tratamiento 2) y analista uno en el día dos (tratamiento 3).

Luego se llevo a cabo el análisis de perfiles y pruebas de hipótesis, para lo que se esperaba que no se presenten diferencias entre los analistas ni los días. Por el número de datos es mandatorio emplear una prueba no paramétrica. La prueba de hipótesis que se planteada para apoyar y constatar lo encontrado, en los gráficos de perfiles es:

$$H_0: \mu T1 = \mu T2 = \mu T3$$

En este caso se va a aplicar el test de Kruskal Wallis, equivalente a la prueba ANOVA para medidas repetidas en la versión no paramétrica. Esta prueba utiliza rangos de datos de tres o más muestras independientes para probar la hipótesis nula, en la que se supone que las muestras provienen de poblaciones con medidas iguales. Para desarrollar el test de Kruskal Wallis no se tienen supuestos de normalidad o alguna distribución en particular, solo es necesario que cada muestra a comparar tenga mínimo 5 observaciones (ver anexo E).

Sea N el número total de observaciones en todas las muestras combinadas, t el número de muestras,  $R_i$  la suma de rangos de la muestra i,  $n_i$  el número de observaciones en la i-ésima muestra. El estadístico de prueba es:

$$H = \left( \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^t R_i^2 \right) - 3(N+1)$$

Si  $H_0$  es cierta la distribución de H se aproxima a una chi-cuadrado con t - 1 grados de libertad; de forma que se rechaza la hipótesis nula para valores de F superiores al valor crítico para el nivel de significación fijado. El estadístico de prueba H es básicamente una medida de la varianza de la sumas de rangos  $R_1; R_2; R_3$ . Si los rangos están distribuidos de forma equitativa entre los grupos muestrales, entonces H debe ser un número pequeño. Si las muestras son muy diferentes, entonces los rangos serán muy bajos en algunos grupos y muy altos en otros, con el resultado de H grande. Entonces solo cuando el valor de H sea grande se rechaza la hipótesis nula de que las muestras vienen

de poblaciones similares. Este análisis se desarrolló tanto para el método como para el sistema de la metodología analítica.

### ▪ **Exactitud**

La exactitud se efectúa intra-ensayo dentro del día, así como para inter-ensayo entre días (EMEA/CHMP/EWP, 2011). Se realiza con el análisis a cuatro niveles de concentración que cubran el rango de la curva de calibración, cada uno con cinco muestras: LLOQ y la concentración baja, media y alta correspondientes a 0,10, 0,25, 1,0, y 5,0 µg/mL. Para la exactitud entre días se analiza los mismos niveles dos días diferentes y la exactitud entre dos analistas. La exactitud se puede expresar como el porcentaje de desviación con respecto al valor de referencia o como el porcentaje de inexactitud mediante la utilización del parámetro error relativo medio (MRE), que se calcula por medio de la siguiente fórmula:

$$MRE = \frac{\text{Media de los resultados obtenidos} - \text{Concentración teórica}}{\text{Concentración teórica}} \times 100$$

### ▪ **Estabilidad**

Se estudió la estabilidad de los plaguicidas en la sangre a corto plazo (6, 12, 24 y 48 horas) cuando permanecen a temperatura ambiente. Estas condiciones de temperatura comprenden a las del tratamiento de la muestra en el laboratorio. Para cada plaguicida en la matriz de sangre se realizó a dos concentraciones diferentes una baja y otra alta (0,25 y 5,0 µg/mL) por triplicado.

La estabilidad también fue evaluada a las mismas concentraciones cuando se almacena a refrigeración a 4 ° C, se analiza las muestras por triplicado después de transcurrida una semana, la segunda, tercera y cuarta semana.

La estabilidad en el automuestreador que se encuentra a 10°C durante 24 horas y una semana a las mismas concentraciones fue analizado y por triplicado.

Cada vez que transcurría el tiempo señalado se prepararon muestras de sangre fresca fortificada a las mismas concentraciones (muestras de comparación). Todas las muestras se analizaron y cuantificaron conjuntamente.

### ▪ Recuperación

La recuperación se determinó para el LLOQ y para los niveles correspondientes a concentración baja, media y alta, es decir (0,10, 0,25, 1,0, y 5,0 µg/mL) mediante el porcentaje de la respuesta del plaguicida después del tratamiento de la muestra en sangre, comparada con la respuesta del sistema que contiene el plaguicida en una concentración correspondiente al 100% de recuperación. En todos los casos, cinco replicas.

### ▪ Efecto matriz

De los enfoques mencionados por la literatura para el estudio del efecto matriz (ME), se utilizó dos de ellos para evaluar la supresión o aumento de la señal de cada plaguicida en la sangre de la metodología analítica que se describe en el presente trabajo:

1) Comparación de las pendientes de las curvas de calibración en presencia de la matriz sangre con respecto a la del sistema en ausencia de matriz. Se analizaron cinco réplicas de cada nivel el primer día con dos analistas y el segundo día con un analista. Para el cálculo del ME se sigue la siguiente ecuación (Kwon, Lehotay, & Geis-Asteggianti, 2012):

$$\text{Efecto Matriz (ME)} = \left( \frac{\text{Pendiente de la curva de calibración en presencia de matriz}}{\text{Pendiente de la curva de calibración en ausencia de matriz}} - 1 \right) \times 100$$

2) Mediante el experimento de adición post-extracción, que consiste en la determinación de las áreas del analito en dos escenarios: el primero conformado por extractos de la matriz blanco provenientes de fuentes diferentes y fortificados después de la extracción (B) y el segundo conformado por el analito en el sistema (A). El efecto matriz se calcula mediante la siguiente ecuación (Peters & Remane, 2012)(Peters et al., 2007)(Nováková, 2012):

$$\text{Efecto Matriz (ME)} = \left( \frac{B}{A} - 1 \right) \times 100$$

Para la evaluación de los efectos de matriz por el método de la post-extracción se utilizaron seis fuentes de blanco de matriz de donadores, los cuales fueron fortificados a dos concentraciones: una baja y otra alta (0,25 µg/mL y 5,0 µg/mL). Es preciso aclarar que en la anterior ecuación los valores A y B corresponden a las áreas del analito normalizadas, esto significa que es la relación de áreas del analito con respecto a su estándar interno deuterado como se ha desarrollado la metodología. Se calcula el coeficiente de variación (CV) para las seis fuentes de sangre (EMEA/CHMP/EWP, 2011).

#### ▪ **Efecto memoria (Carry over)**

La evaluación del efecto memoria se realizó con el análisis de muestras blanco después del punto de calibración más alto, esto es, a una concentración de 5 µg/mL. El efecto memoria en la muestra blanco inyectada después de la concentración de 5 µg/mL no debe ser mayor que el 20% del límite de cuantificación (EMEA/CHMP/EWP, 2011) .

#### ▪ **Intensidad relativa de los iones**

La precisión de la intensidad relativa de los iones se determina con respecto a la relación entre la intensidad de las dos transiciones monitoreadas para cada plaguicida (intensidad transición cuantificadora/intensidad transición cualificadora) en términos del CV de los niveles de calibración LLOQ y las concentraciones baja, media y alta del rango estudiado correspondiente a 0,10, 0,25, 1,0, y 5,0 µg/mL del valor obtenido para este parámetro en dos días diferentes (cada día con cinco réplicas). El valor medio de la intensidad relativa de las transiciones monitorizadas para todos los compuestos es también registrado (SANCO/12495/2011, 2011).

En la tabla 3-11 se encuentra los parámetros de la validación de la metodología descrita con sus respectivos experimentos y criterios de aceptación.

**Tabla 3-11:** Resumen del estudio de validación de la metodología descrita.

| Parámetro de Validación               | Experimento   | Criterios de Aceptación   |
|---------------------------------------|---|---|
| <b>Selectividad</b>                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 6 muestras procedentes de distintos occisos.</li> <li>- 6 muestras procedentes de distintos individuos vivos.</li> <li>- Blancos de sangre fortificados sólo con los estándares internos.</li> <li>- Blancos de sangre fortificados con xenobióticos comunes en casos forenses.</li> </ul>         | Ausencia de interferencias  |
| <b>Linealidad y Rango del sistema</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Curvas elaboradas con siete niveles de concentración (n=5) en metanol con los estándares internos a 0,25 µg/mL, secado y reconstituido con la solución de reconstitución.</li> <li>- Rango de 0,10 – 5,0 µg/mL.</li> </ul>   | <p>Prueba t para el coeficiente de correlación <math>t_{exp} &gt; t_{tab}</math><br/>Rechaza <math>H_0</math>. Existe correlación.</p> <p>Prueba t para la pendiente. <math>t_{exp} &gt; t_{tab}</math> rechazo <math>H_0</math>. La pendiente es estadísticamente diferente de cero.</p> <p>Prueba t para el intercepto <math>t_{exp} &lt; t_{tab}</math>. No se rechaza <math>H_0</math>. El intercepto no es estadísticamente diferente de cero.</p> |
| <b>Linealidad y Rango del método</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Curvas elaboradas (n=5) en sangre.</li> <li>- 7 niveles de concentración con los estándares internos a 0,25 µg/mL</li> <li>- Rango de 0,10 – 5,0 µg/mL.</li> </ul>   | <p>Prueba t para el coeficiente de correlación <math>t_{exp} &gt; t_{tab}</math><br/>Rechaza <math>H_0</math>. Existe correlación.</p> <p>Prueba t para la pendiente. <math>t_{exp} &gt; t_{tab}</math> rechazo <math>H_0</math>. La pendiente es estadísticamente diferente de cero.</p> <p>Prueba t para el intercepto <math>t_{exp} &lt; t_{tab}</math>. No se rechaza <math>H_0</math>. El intercepto no es estadísticamente diferente de cero.</p> |
| <b>Precisión/exactitud y LLOQ</b>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Repetibilidad: Análisis de sangre fortificada al LLOQ, concentración baja, media y alta con respecto al rango de calibración.</li> <li>- Replicados (n=5) de las concentraciones mencionadas.</li> <li>- Rango de 0,10 – 5,0 µg/mL.</li> <li>- Precisión intermedia: Cada concentración</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- C.V ≤ 15% y M.R.E. ± 15% para las concentraciones baja, media y alta.</li> <li>- C.V ≤ 20% y M.R.E. ± 20% para el LLOQ.</li> <li>- Análisis estadístico de perfiles para medidas</li> </ul>  |

|   |  |   |
|---|--|---|
|   | el mismo día por dos analistas y dos días por el mismo analista. Replicados (n=5).   | repetidas. Test de Kruskal Wallis. Se acepta Ho. No hay diferencia entre los días y los analistas.    |
| <b>LOD</b>  | Disminución de concentración de analitos en sangre hasta encontrar la mínima concentración de plaguicida identificable con sus transiciones características y un S/N mayor a 3. Replicados (n=5)   | S/N sea igual o mayor a 3 y las dos transiciones diferenciables.                                      |
| <b>Estabilidad<br/>Temperatura ambiente<br/>Refrigeración<br/>Automuestreador</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sangre fortificada a la concentración baja y alta (por triplicado) almacenadas a temperatura ambiente 6, 12, 24, y 48 horas (muestras estabilidad).</li> <li>- Sangre fortificada a la concentración baja y alta (por triplicado) almacenadas a refrigeración a 4 ° C durante la semana (1, 2, 3 y 4) (muestras estabilidad).</li> <li>- Sangre fortificada a la concentración baja y alta (por triplicado) en el automuestreador que se encuentra a 10°C durante 24 horas y una semana.</li> <li>- Preparación de muestras frescas (muestras control) a ambas concentraciones (por triplicado).</li> </ul> | Estabilidad entre el 80%-120% respecto a la media de los valores obtenidos para las muestras control. |
| <b>Recuperación</b>   | - Análisis de sangre fortificada al LLOQ, concentración baja, media y alta con respecto al rango de calibración, se le aplica el tratamiento de la muestra, comparadas con la respuesta de las mismas concentraciones pero sin matriz denominado el sistema. Replicados (n=5).   | Mayor al 50%  |
| <b>Efecto Matriz</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Comparación de las pendientes de las curvas de calibración en presencia de la matriz sangre con respecto a la del sistema en ausencia de matriz.</li> <li>- Método de la post-extracción a dos concentraciones: una baja y otra alta. Seis fuentes de blanco de matriz de donadores, los cuales fueron fortificados a las concentraciones mencionadas.</li> </ul>   | Aplicaciones clínicas y forenses $\pm 25\%$ y $CV \leq 15\%$  |
| <b>Efecto memoria</b>   | - Análisis de muestras blanco después del ULOQ.  | Respuesta del Blanco no debe ser mayor que el 20% LLOQ.   |
| <b>Intensidad Relativa de iones</b>   | - Análisis de sangre fortificada al LLOQ, concentración baja, media y alta con respecto al rango de calibración analizadas en dos días diferentes. Replicados (n=5) cada día.  | Intensidad relativa $\pm 20\%$ y $CV \leq 20\%$   |

### 3.6 Análisis de datos

Con el propósito de obtener los parámetros de validación, se cuantifica mediante el método del estándar interno y se define para la curva de calibración la variable independiente (**x**) a la concentración: como la cantidad presente de plaguicida en la muestra expresada en  $\mu\text{g/mL}$  y la variable dependiente (**y**) la respuesta: como la relación de áreas entre el plaguicida y su estándar interno deuterado.

La recolección de datos fue realizada directamente de los reportados por el LC-MS, dotado con el software *Xcalibur* como sistema de adquisición de datos y control. Adicionalmente se utilizaron los módulos de procesamientos de datos cualitativos y cuantitativos: *Qual Browser* para análisis cualitativo de cromatogramas y espectros de masas, y el *Quan Browser* para análisis cuantitativo.

El análisis de datos se lleva a cabo mediante el programa excel versión 2007 y para el análisis estadístico del parámetro de precisión en la validación y los casos forenses se empleó el programa SPSS versión 18.0.

### 3.7 Consideraciones éticas del estudio

El presente estudio se desarrollará conforme a las consideraciones éticas de la resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia. De acuerdo al riesgo inherente al estudio, se clasifica como investigación con riesgo mínimo según el artículo 11 de la resolución mencionada, porque consiste en un estudio experimental de casos que incluye registro de datos básicos como género y ubicación; así como el análisis de muestras de sangre de occisos tomadas por el personal idóneo de patología que llegan debidamente marcadas y rotuladas al Laboratorio de Toxicología del Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la ciudad de Bogotá.

### 3.7.1 Consideraciones éticas de la muestra

#### ▪ Área de análisis

Estación de Plaguicidas Laboratorio de Toxicología Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses Bogotá (Anexo A).

#### ▪ Responsable de la muestra e información de la misma

Perito forense a cargo del análisis y del caso.

Durante el tiempo de mi permanencia como estudiante en el Laboratorio de Toxicología, específicamente en la estación de plaguicidas, se desarrollaron los objetivos del presente trabajo con muestras de sangre de casos forenses que fueron analizadas por dos procedimientos simultáneamente dado que los fines que se persiguen son los mismos; identificar Plaguicidas.

- Uno por el procedimiento rutinario realizado por el perito forense.
- El segundo es el desarrollo de la metodología analítica presentada en este trabajo con el fin de mejorar la sensibilidad de respuesta de estas sustancias (aldicarb, carbofurano y metamidofos) realizado bajo la supervisión del perito forense y el docente Director de Tesis.
- Las muestras siempre estuvieron bajo la responsabilidad y supervisión del perito forense del laboratorio asignado.
- Las muestras para el estudio serán anónimas y solo se tendrá acceso a la información mínima requerida para el estudio y la información recolectada será tratada con la misma rigurosidad de confidencialidad dada a los documentos emitidos por el Instituto de Medicina Legal para las autoridades competentes.

Así mismo, es de resaltar que el Laboratorio de Toxicología del Instituto de Medicina Legal al estar aplicando la norma ISO 17025, constata cada uno de sus análisis en el marco del sistema de calidad para garantizar la confiabilidad de sus reportes. De este modo cada muestra forense ingresa bajo el sistema de cadena de custodia; y la trazabilidad de sus análisis son registrados y almacenados en sus archivos. Así como la confidencialidad de los mismos (Anexo C).

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1 Optimización del sistema instrumental

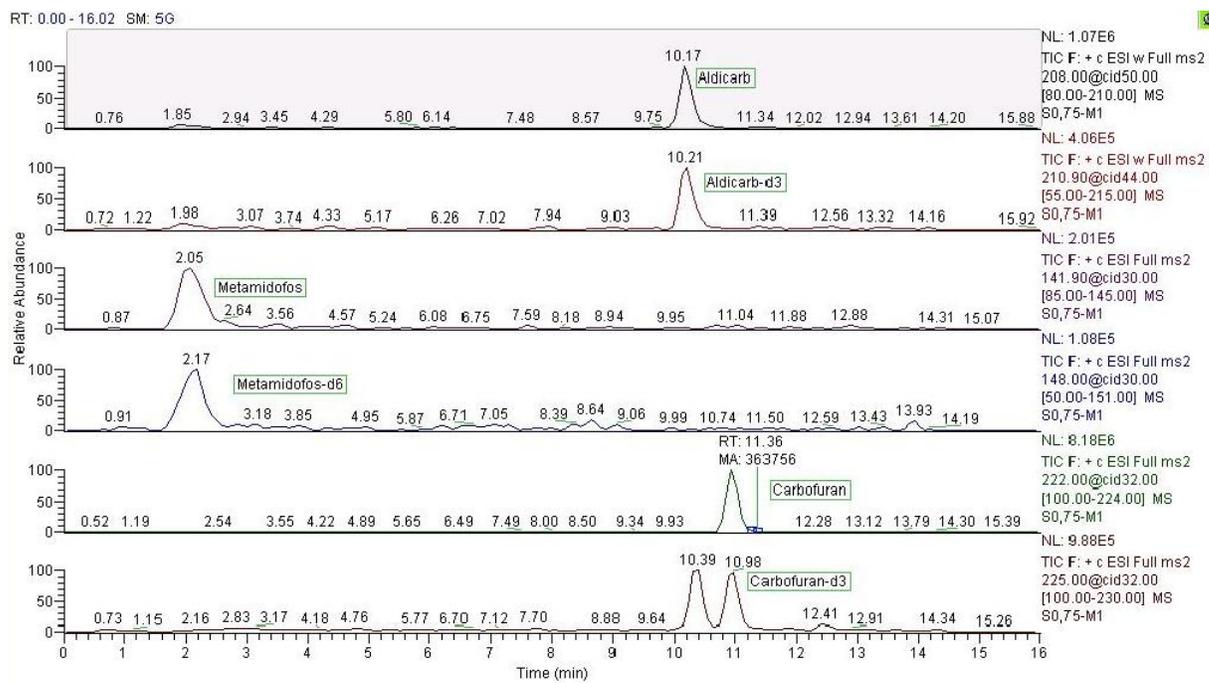
Como ya se ha mencionado, los requerimientos a nivel cromatográfico se minimizan cuando se utiliza un espectrómetro de masas como sistema de detección mediante la selección de las transiciones específicas de los compuestos en estudio, por lo tanto no es necesaria la resolución completa entre ellos como sucede con los demás detectores acoplados a técnicas cromatográficas. Sin embargo, como la matriz sangre es compleja, en el sentido que presenta diversos compuestos endógenos que podrían competir por el sistema de ionización, se hace necesario establecer una separación entre los plaguicidas en estudio para garantizar resultados cuantitativos con precisión y exactitud, más aun cuando se realiza la ionización ESI.

Con el objetivo de lograr la separación del aldicarb, carbofurano y metamidofos, se ensayaron tres diferentes columnas cromatográficas todas en fase reversa pero con distinto tamaño de partícula y longitud: SB-C18 (100 mm x 2,1 mm ID, 2,7  $\mu\text{m}$ ), RP-18 (100 mm x 4,6 mm ID, 2  $\mu\text{m}$ ) y PFP (50 mm X 2,1 mm ID, 5  $\mu\text{m}$ ). Aunque con todas ellas se obtuvieron resultados similares, la columna PFP de menores dimensiones permite una disminución significativa en el tiempo de análisis y por lo tanto fue seleccionada para el presente estudio.

La ionización utilizando la interfase API en modo positivo fue elegida en función de los grupos funcionales del aldicarb, carbofurano y metamidofos que tienden a formar cationes y el empleo de fases móviles ácidas es conveniente para favorecer la formación de estos cationes. Para la optimización de los componentes de la fase móvil, se realizaron ensayos con los modificadores orgánicos metanol y acetonitrilo, y con los aditivos de formiato de amonio y ácido fórmico, la selección de una fase móvil compuesta por una mezcla de una solución acuosa de formiato de amonio de 10 mM con 0,1% de ácido fórmico y metanol con 0,1% de ácido fórmico a un flujo constante de 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  permitió la separación e identificación de los plaguicidas en estudio con una sensibilidad adecuada.

Bajo las condiciones seleccionadas de fase estacionaria y programación de la fase móvil, la elución de los plaguicidas aldicarb, carbofurano y metamidofos se efectuó en 12 minutos, con una duración total del corrido cromatográfico de 16 minutos para permitir el equilibrio de la columna antes de la siguiente inyección. De este modo, se obtuvieron picos con adecuada simetría para los plaguicidas de análisis (Figura 4-19)

**Figura 4-19:** Cromatograma obtenido para el aldicarb, carbofurano y metamidofos con sus respectivos estándares internos isotópicos deuterados.



El método propuesto en el presente estudio, permite la determinación del aldicarb, carbofurano y metamidofos con sus respectivos estándares internos deuterados en un tiempo de 16 minutos.

## 4.2 Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

Una vez el espectrómetro de masas fue calibrado, se realizó el tune con el aldicarb-d<sub>3</sub> en modo ESI positivo y los parámetros optimizados se toman como referencia en el método de análisis como se mencionó en el metodología. Algunas de las condiciones seleccionadas y optimizadas para el espectrómetro de masas se encuentran en la tabla 4-12.

**Tabla 4-12:** Condiciones del espectrómetro de masas optimizados.

| <b>Parámetros de la fuente (ESI+)</b> |           |
|---------------------------------------|-----------|
| Voltaje de capilar                    | 9,00 V    |
| Voltaje de la fuente                  | 5,00 kV   |
| Temperatura del capilar               | 160 °C    |
| Voltaje de las lentes                 | 5V        |
| Flujo del gas de desolvatación        | 55 L/min  |
| Flujo del gas auxiliar                | 15 L/min  |
| <b>Sistema óptico</b>                 |           |
| Voltaje multipolo 1                   | -1,00V    |
| Voltaje multipolo 2                   | -6,00V    |
| Voltaje lentes intermultipolos        | -16,00V   |
| Radiofrecuencia amplificada multipolo | 400 V p-p |
| <b>Sistema de detección</b>           |           |
| Voltaje dinodo                        | -14,72 kV |
| Multiplicador                         | -935 V    |

El espectro de masas para cada plaguicida fue obtenido mediante ESI en modo positivo, por medio de la infusión de cada plaguicida en metanol a una concentración de 2,0 µg/mL empleando una bomba jeringa en “T” que se combina con la fase móvil utilizada en la metodología a una proporción de 50:50 (v/v) que fluye del sistema cromatográfico a 200 µL/min y se dirigen hacia el espectrómetro de masas.

Los parámetros del espectrómetro de masas no son modificables para cada uno de plaguicidas y estándares internos deuterados a excepción del ancho de aislamiento “isolation width” y la energía de colisión. Por lo tanto, se seleccionaron los valores con los que se obtuvo mejor señal para la mayoría de los analitos. Las principales condiciones elegidas se encuentran en la tabla 4-13.

Como se ha mencionado, la guía SOFT recomienda el uso de dos iones producto para el monitoreo con espectrometría de masas (SOFT / AAFS Forensic Laboratory Guidelines, 2006), en este sentido se determinaron los dos fragmentos más abundantes y representativos para cada uno de los analitos correspondientes a las transiciones en

tándem MS/MS y la energía de colisión óptima con la que se consigue la mayor sensibilidad para la transición con el cual se va a cuantificar. De este modo, en el monitoreo de iones producto (product ion scan) se seleccionó un fragmento o ion producto y se define como el ion cuantificador (subrayado en la tabla) y el otro como ion cualificador. En la tabla 4-13 se resumen las condiciones óptimas MS/MS, los iones productos (transiciones) y el tiempo de retención (TR) obtenido para cada compuesto.

**Tabla 4-13:** Condiciones del método LC-MS/MS tándem utilizado en la detección de los compuestos en estudio.

| Compuesto                       | Transición                           | EC (%) | isolation width | Polaridad | Sistema |      | Método |      |
|---------------------------------|--------------------------------------|--------|-----------------|-----------|---------|------|--------|------|
|                                 |                                      |        |                 |           | TR      | TRR  | TR     | TRR  |
| Aldicarb                        | <u>207,9</u> → 115,9<br>207,9 → 88,9 | 50     | 2               | positiva  | 10,10   |      | 10,16  |      |
|                                 |                                      |        |                 |           |         | 1,00 |        | 1,00 |
| Aldicarb-d <sub>3</sub> (SI)    | <u>210,9</u> → 115,9<br>210,9 → 89   | 44     | 2               | positiva  | 10,08   |      | 10,14  |      |
| Carbofuran                      | <u>222,0</u> → 165<br>222,0 → 122,9  | 32     | 2               | positiva  | 10,89   |      | 10,92  |      |
|                                 |                                      |        |                 |           |         | 1,00 |        | 1,00 |
| Carbofuran- d <sub>3</sub> (SI) | <u>225,1</u> → 165<br>225,1 → 122,9  | 32     | 2               | positiva  | 10,91   |      | 10,91  |      |
| Metamidofos                     | <u>141,9</u> → 111,9<br>141,9 → 93,9 | 30     | 1               | positiva  | 2,00    |      | 2,08   |      |
|                                 |                                      |        |                 |           |         | 1,01 |        | 1,01 |
| Metamidofos-d <sub>6</sub> (SI) | <u>148,1</u> → 114,9<br>148,1 → 96,9 | 30     | 1               | positiva  | 1,98    |      | 2,06   |      |

(SI) Estándar Interno. (EC) Energía de Colisión.

Como se mencionó en el marco conceptual, en las interfases API se produce una ionización suave de los compuestos, siendo en modo positivo el ion  $[M+H]^+$  la especie mayoritaria o ion precursor del cual se realiza el monitoreo de iones producto. Para la detección de cada plaguicida y los estándares internos deuterados se utilizó el tiempo de retención relativo, las dos transiciones correspondientes a una cuantitativa y otra cualitativa y la intensidad relativa de los iones. En las figuras 4-20, 4-21, 4-22, 4-23, 4-24 y 4-25 se muestran los espectros de masas para cada compuesto obtenido por el monitoreo de los iones producto (product ion scan) a las energías de colisión elegidas en cada caso. Igualmente, se indica el patrón de fragmentación propuesto para cada compuesto.

Figura 4-20: Espectro de masas obtenido del aldicarb.

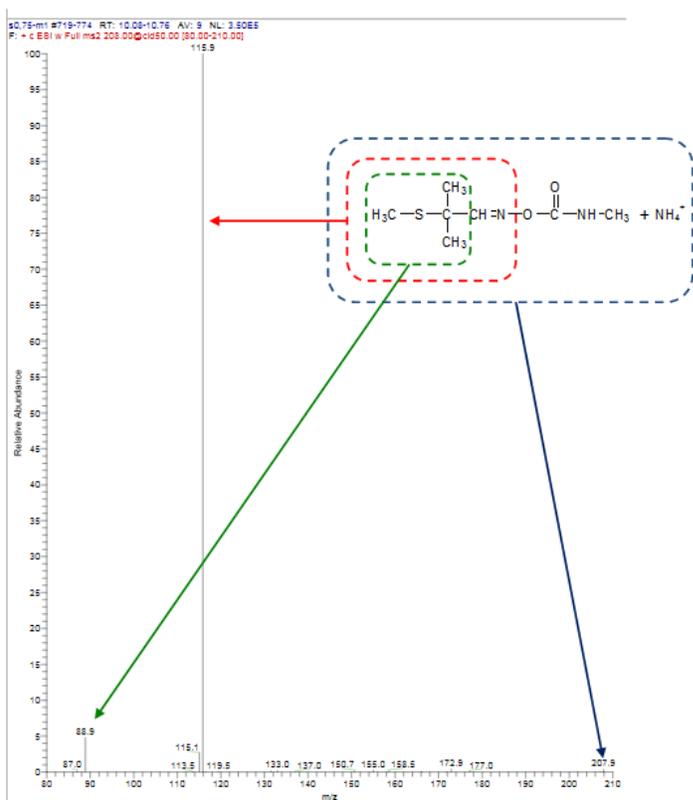
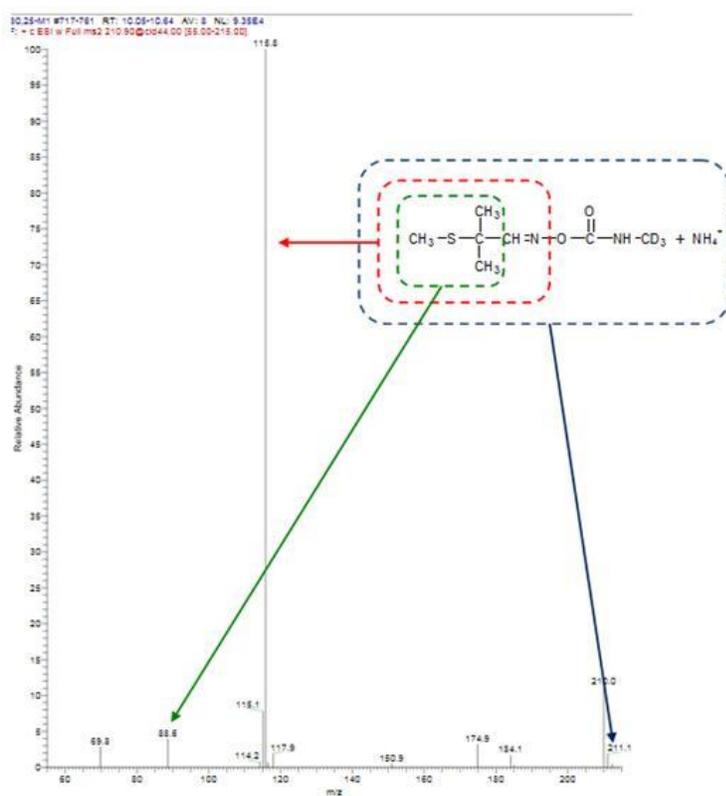
Figura 4-21: Espectro de masas obtenido del aldicarb - d<sub>3</sub>.

Figura 4-22: Espectro de masas obtenido del carbofuran.

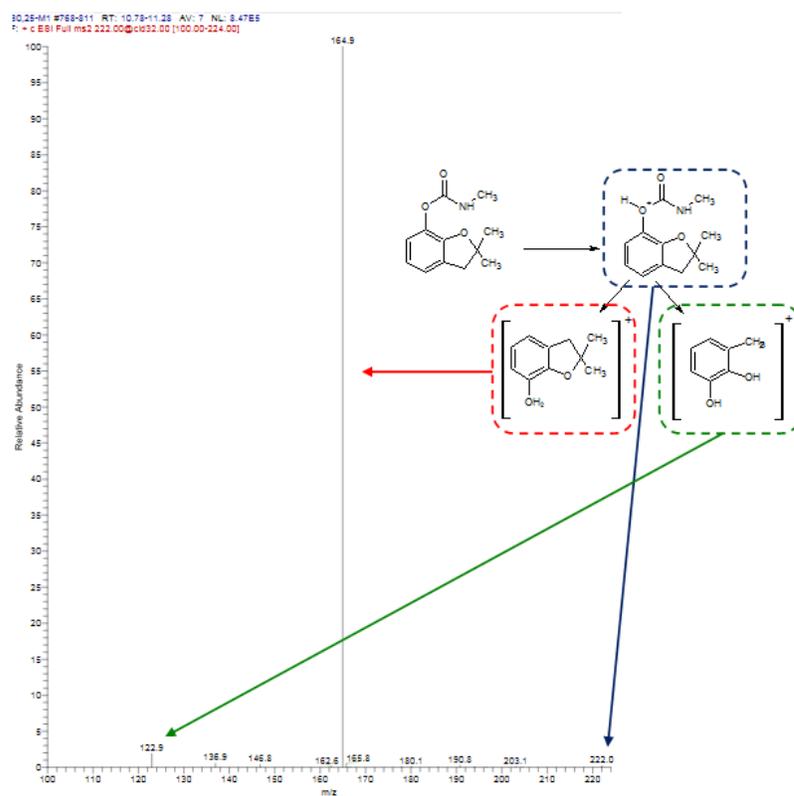
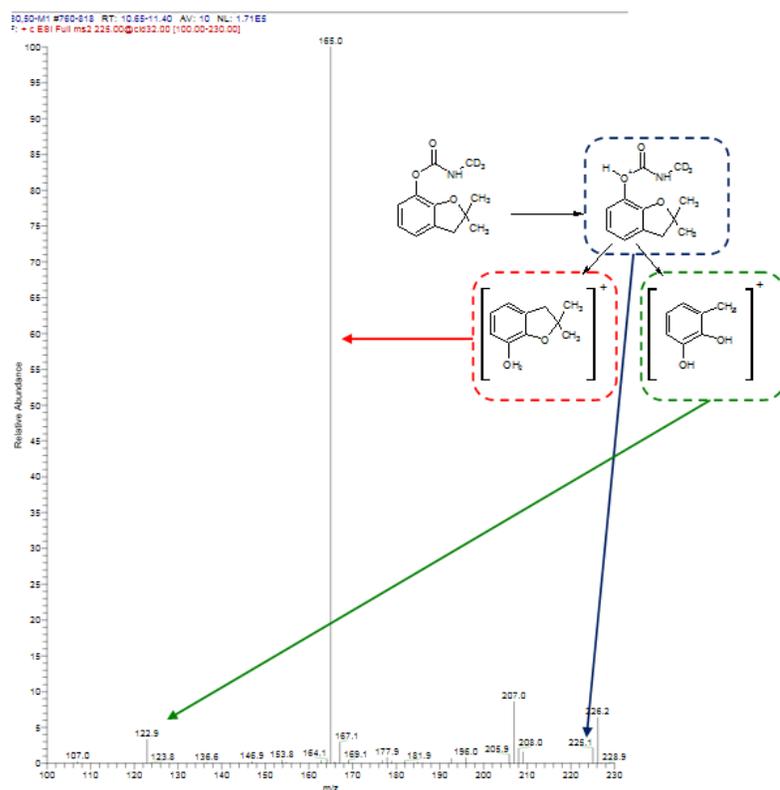
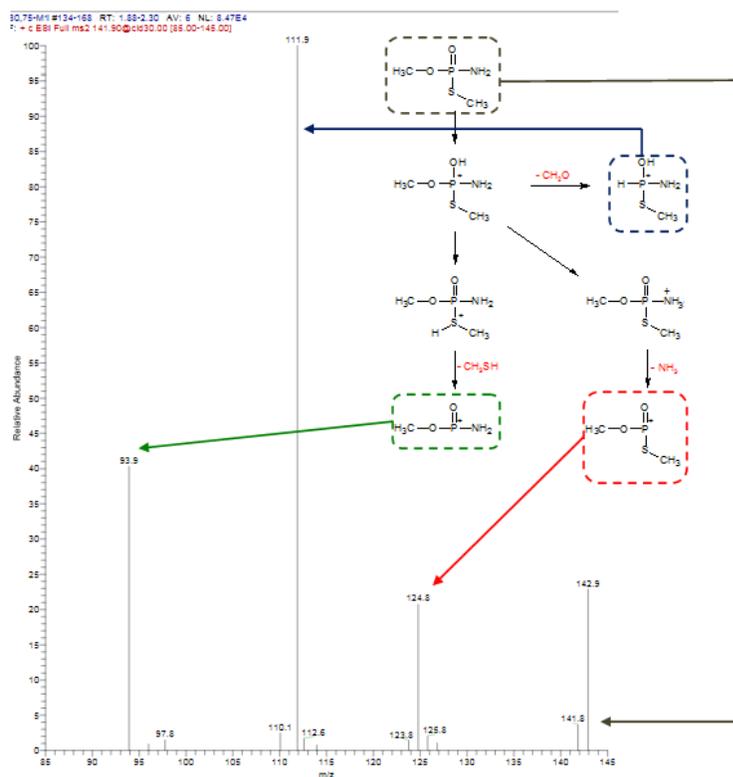
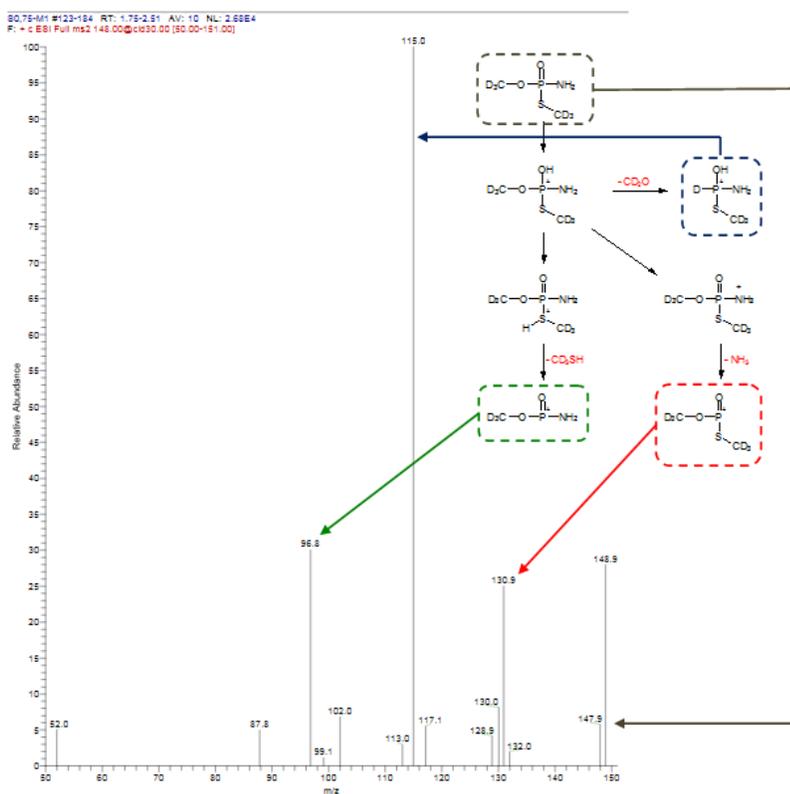
Figura 4-23: Espectro de masas obtenido del carbofuran- $d_3$ .

Figura 4-24: Espectro de masas obtenido del metamidofos.

Figura 4-25: Espectro de masas obtenido del metamidofos-  $\text{d}_6$ .

El analizador del espectrómetro de masas en tándem empleado para la elaboración de esta metodología analítica es cuadrupolo con trampa de iones (QIT), que realiza el tándem en el tiempo. Este tipo de espectrómetro ha sido utilizado como se expresó en el marco conceptual para la determinación cuantitativa de plaguicidas (Picó et al., 2004)(Alder & Greulich, 2006).

### **4.3 Tratamiento de la muestra**

Para el análisis de plaguicidas se han documentado diferentes métodos de extracción y tratamiento de la muestra tanto a nivel de muestras ambientales y alimentos, como muestras biológicas de interés en toxicología clínica y forense (Picó et al., 2004) (Martínez Vidal et al., 2009)(Proença et al., 2004)(Lacassie, Marquet, et al., 2001)(Salihovic et al., 2012). Sin embargo, la determinación de plaguicidas y sus metabolitos en muestras reales es un procedimiento complejo debido a las características fisicoquímicas enunciadas de los plaguicidas que comprende la variedad en su polaridad, termolabilidad y la necesidad de obtener bajos límites de detección.

El tratamiento de muestra seleccionado para esta metodología consiste en una precipitación simple de proteínas empleando acetonitrilo frío, secando y reconstituyendo en la fase móvil para el análisis por LC/MS. Tratamientos similares se han utilizado a nivel internacional como se ha mencionado en el marco conceptual (Salm et al., 2009)(Mostafa et al., 2011)(Inoue et al., 2007).

Aunque inicialmente se probó la extracción en fase sólida SPE, este procedimiento involucra mayor tiempo de análisis. El procedimiento de tratamiento de muestra propuesto por este estudio favorece el análisis en toxicología forense en dos aspectos: primero el requerimiento de una cantidad de sólo 1,0 mL de sangre para desarrollar el análisis y segundo la rapidez con que se lleva a cabo el tratamiento de la muestra. Ambos aspectos proporcionan ventajas a nivel forense, puesto que cuando se enfrenta a la situación de encontrarse con una muerte en estudio sin indicios de cual posible sustancia está involucrada. Previamente en el laboratorio de toxicología se realizan otros análisis para detectar otras sustancias como drogas de abuso, medicamentos, alcoholes entre otros; que van disminuyendo la cantidad de sangre disponible que llega con el caso. Además se obtiene un resultado en poco tiempo que suministre información de

intoxicación por los plaguicidas en estudio como posible causa de muerte. Finalmente, con la determinación del límite de detección en la validación se demuestra que con el tratamiento de la muestra planteado, se tienen resultados óptimos.

En cuanto a las técnicas empleadas por otros autores en la extracción de plaguicidas, las utilizadas han sido las extracciones líquido-líquido y las extracciones en fase sólida, en la mayoría de los casos para un número limitado de compuestos, generalmente pertenecientes al mismo grupo químico de plaguicidas (Salm et al., 2009)(Martínez Vidal et al., 2009) (Kudo et al., 2012)(Tennakoon et al., 2012). Se han descrito procedimientos de extracción líquido-líquido empleando distintos solventes orgánicos. Sin embargo, este procedimiento ha sido reemplazado por la extracción en fase sólida y el procedimiento de preparación de muestras para el análisis de plaguicidas en el ámbito ambiental y de seguridad alimentaria denominado QuEChERS referente a las siglas en inglés de Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust y Safe, que traducen rápido, fácil, económico, efectivo, robusto y seguro. Esta metodología consiste en una extracción simplificada de un gran número de residuos de plaguicidas multiclase y multiresiduo en frutas y vegetales (Sinha et al., 2011)(Wilkowska & Biziuk, 2011)(B Kmellár et al., 2008)(Cervera et al., 2012)(Béla Kmellár et al., 2011)(Martínez Vidal et al., 2009).

Para muestras biológicas, es el caso de la matriz sangre también se ha utilizado la extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida (Proença et al., 2004)(Martínez Vidal et al., 2009)(Tennakoon et al., 2012)(Lacassie, Dreyfuss, et al., 2001). Esta última más recomendada pero presenta la limitación de la elección del cartucho de fase estacionaria selectivo de acuerdo al grupo de plaguicidas en análisis, así como el adecuado orden de elución según los solventes que se elijan (Park et al., 2009)(Lacassie, Dreyfuss, et al., 2001)(Kudo et al., 2012)(Dulaurent et al., 2010). Entre otras técnicas empleadas en menor cantidad ha sido la microextracción en fase sólida (SPME) (Asri Kamarruddin, 2000).

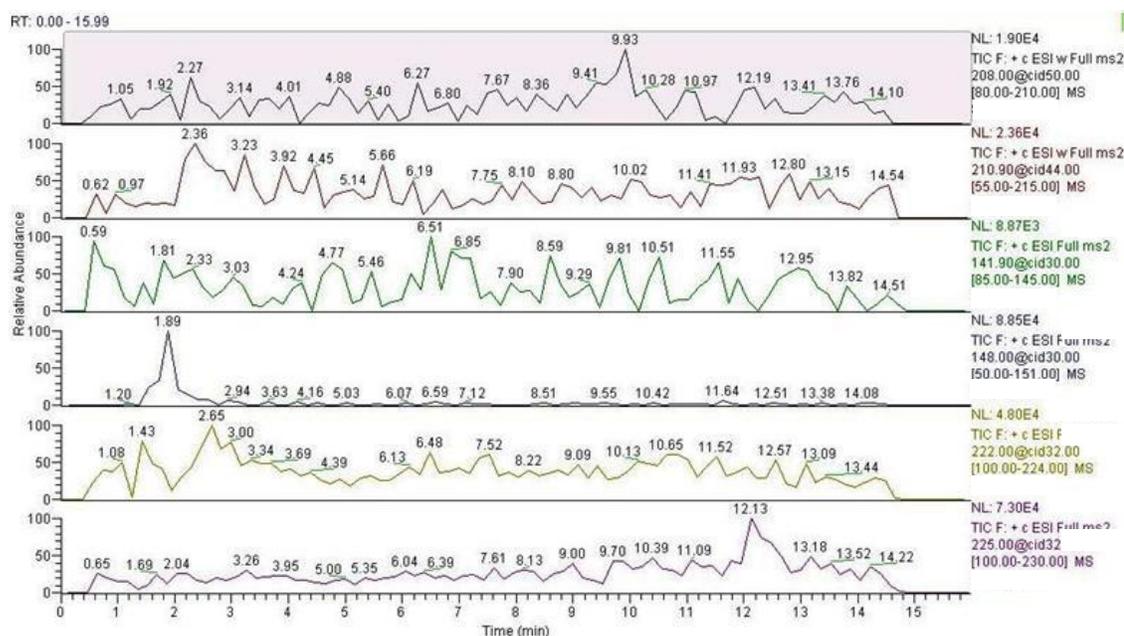
## 4.4 Validación de la metodología analítica

### 4.4.1 Selectividad

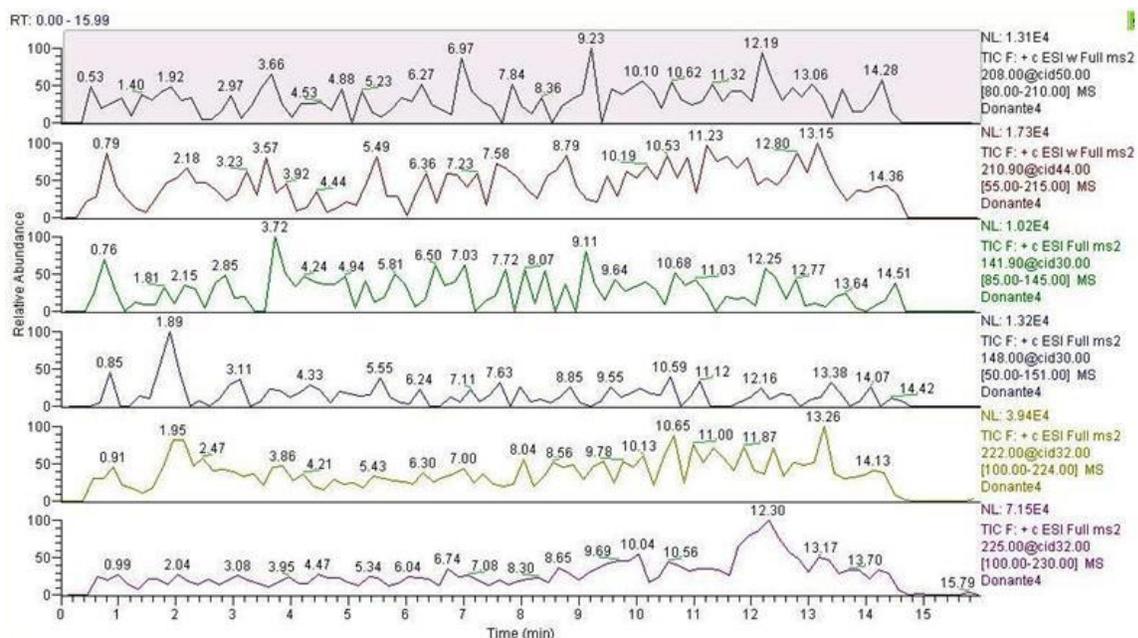
En la figura 4-26 se muestra los cromatogramas de las transiciones (ion precursor e iones producto) de todos los compuestos que se encuentran en la metodología (los tres plaguicidas y sus estándares internos) transcurrido el análisis de un blanco de sangre de un occiso y un blanco de un donante. No se observan interferencias en el tiempo de retención de cada uno de los plaguicidas en estudio en los doce blancos. Sin embargo, si se observa un pico en la transición del estándar interno carbofuran- $d_3$  en el tiempo 10,32 minutos en uno de los blancos. Al analizar el espectro de masas que se obtiene para este pico no se relaciona con el patrón de fragmentación del carbofuran- $d_3$  y no altera su respuesta, ya que el carbofuran- $d_3$  aparece claramente en el tiempo 10,91 minutos. Esta situación permite deducir que puede ser un compuesto endógeno de la sangre característico, que en esencia no afectaría el resultado para el estándar interno por el tiempo de retención y el espectro de masas diferentes (Figura 4-27).

**Figura 4-26:** Cromatograma del método tándem para cada uno de los plaguicidas obtenidos tras el análisis de una muestra blanco de sangre de un occiso (A) y una muestra blanco de sangre de un donante vivo (B)

**A**

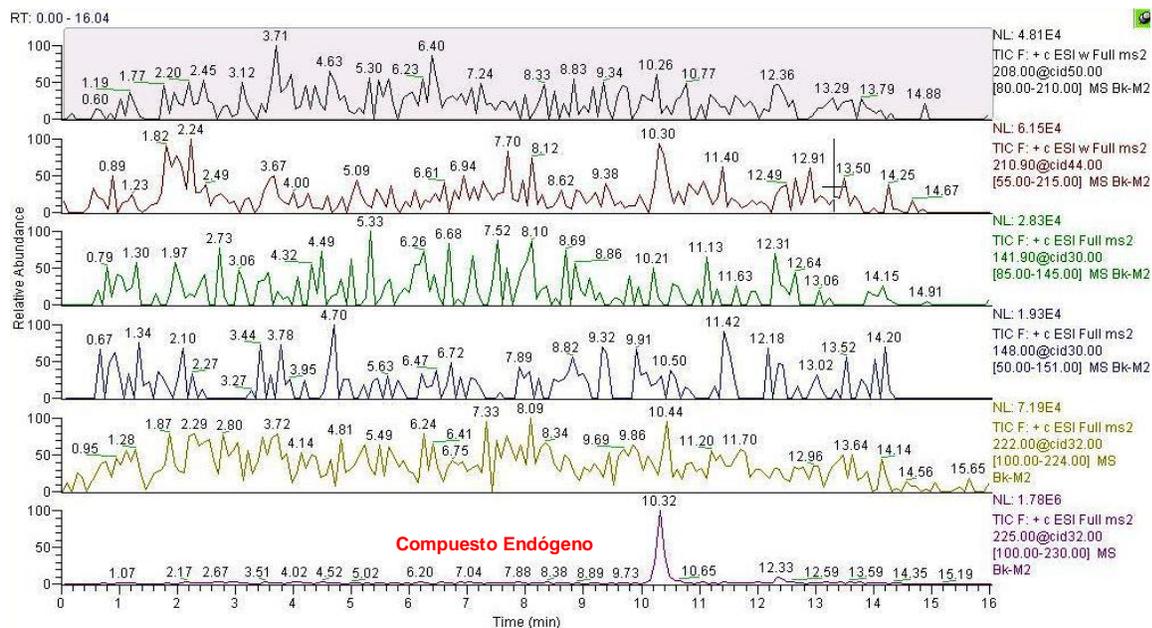


B

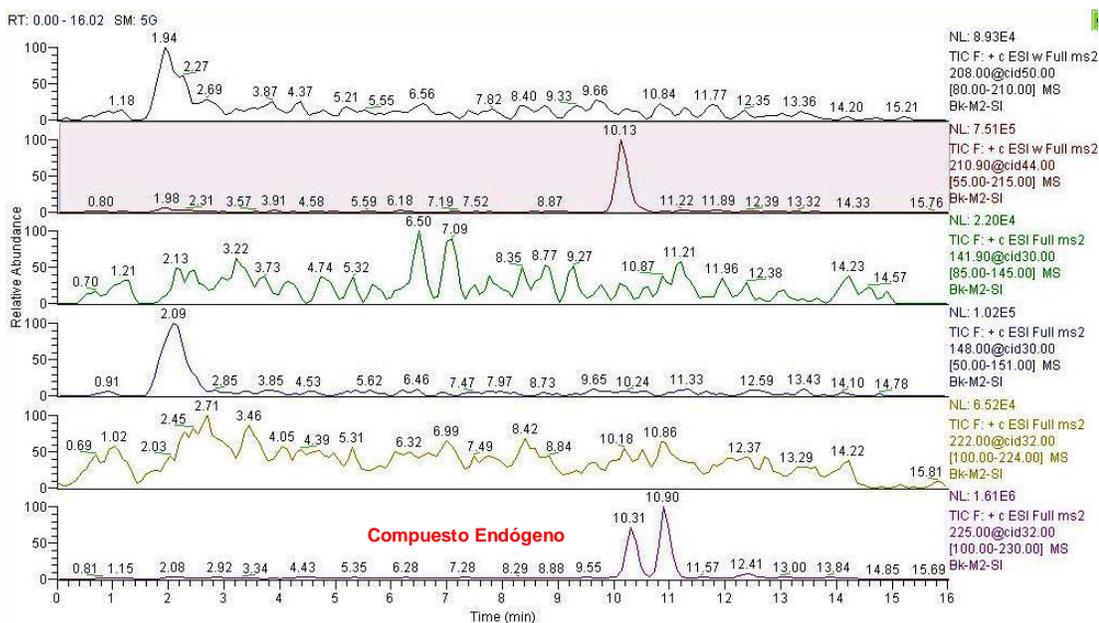


**Figura 4-27:** Cromatogramas del método tándem para cada uno de los plaguicidas obtenidos tras el análisis de una muestra blanco de sangre (A) y un blanco de sangre con estándar interno isotópico deuterado (B).

A



B

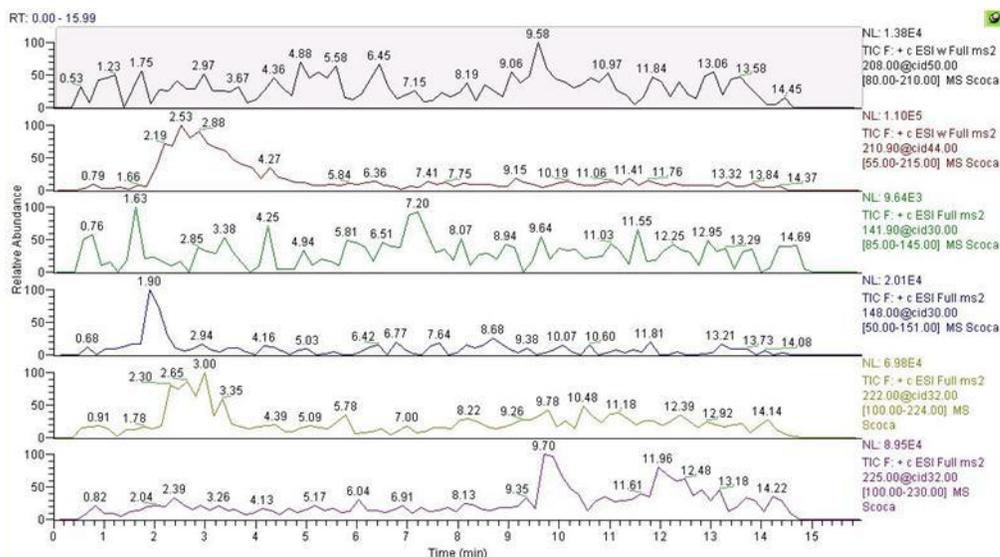


El análisis de la posible contribución de los estándares internos a la señal adquirida por los plaguicidas análogos sin deutar fue evaluada con el corrido de muestras blanco de la matriz de sangre que contenía únicamente estándar interno cada vez que se preparó una curva de calibración. No se registraron picos en los correspondientes tiempos de retención de cada plaguicida atribuido a la presencia de sus estándares internos.

Otras sustancias que pueden encontrarse en casos forenses son drogas de abuso como cocaína y opiáceos con sus respectivos metabolitos o medicamentos que suelen prescribirse para la depresión y otros trastornos de ansiedad como las benzodiazepinas, fenotiazinas y antidepresivos tricíclicos, entre otros. En este sentido, se descartó la aparición de interferencias originadas por los xenobióticos: oxazepam, nordiazepam, lorazepam, 7-aminoflunitrazepam, 7-aminoclonazepam, diazepam, midazolam, alfavhidroximidazolam, alprazolam, nitrazepam, temazepam, flunitrazepam, bromazepam, triazolam, hidroxitriazolam, clonazepam, escopolamina, clorpromazina, levomepromazina, tioridazina, trifluoperazina, amitriptilina, nortriptilina, imipramina, desipramina, zolpidem, trazodona, cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina, morfina, codeína y 6-acetilmorfina; cuando se analizó los blancos fortificados a 0,10 µg/mL. En la figura 4-28 como ejemplo, se muestra el cromatograma de las transiciones de los plaguicidas, obtenido de una sangre blanco fortificada con cocaína, benzoilecgonina y cocaetileno.

Las transiciones características para cada uno de los compuestos analizados y su tiempo de retención, que descartan la posibilidad de interferencia con estos analitos de interés forense se encuentran en la tabla 4-14.

**Figura 4-28:** Cromatograma del método tándem para cada uno de los plaguicidas obtenido tras el análisis de una muestra de sangre con cocaína, benzoilecgonina y cocaetileno.



**Tabla 4-14:** Transiciones características de los xenóbiticos analizados para la selectividad utilizando LC-MS/MS.

| Compuesto            | Transición    | Tiempo de Retención (TR) |
|----------------------|---------------|--------------------------|
| Oxazepam             | 287,1 → 241   | 8,05                     |
|                      | 287,1 → 269   |                          |
| Nordiazepam          | 271,1 → 243,2 | 7,77                     |
|                      | 271,1 → 140   |                          |
| Lorazepam            | 321,1 → 275,0 | 7,49                     |
|                      | 321,1 → 303   |                          |
| 7-Aminoflunitrazepam | 284,1 → 256,2 | 6,92                     |
|                      | 284,1 → 163,2 |                          |
| 7-Aminoclonazepam    | 286,2 → 256,2 | 6,64                     |
|                      | 286,2 → 222,1 |                          |
| Diazepam             | 285,1 → 257,1 | 8,13                     |
|                      | 285,1 → 193   |                          |
| Midazolam            | 325,8 → 291,2 | 7,85                     |
|                      | 325,8 → 244   |                          |
| Alfahidroximidazolam | 342,1 → 203,0 | 7,55                     |
|                      | 342,1 → 324   |                          |
| Alprazolam           | 309,1 → 274,2 | 7,54                     |
|                      | 309,1 → 205   |                          |

| Compuesto        | Transición                     | Tiempo de Retención (TR) |
|------------------|--------------------------------|--------------------------|
| Nitrazepam       | 282,1 → 236,1<br>282,1 → 180   | 8,56                     |
| Temazepam        | 301,1 → 255,0<br>301,1 → 283   | 7,71                     |
| Flunitrazepam    | 314,0 → 268,2<br>314,0 → 239   | 7,72                     |
| Bromazepam       | 316,1 → 288,1<br>316,1 → 209,2 | 7,96                     |
| Triazolam        | 343,1 → 308,2<br>343,1 → 239,1 | 7,70                     |
| Hidroxitriazolam | 359,1 → 313,1<br>359,1 → 341   | 7,31                     |
| Clonazepam       | 316,0 → 270,1<br>316,0 → 241   | 7,94                     |
| Flurazepam       | 388 → 315,1<br>316,0 → 317,1   | 8,34                     |
| Escopolamina     | 304,2 → 138,1<br>304,2 → 103,1 | 5,98                     |
| Clorpromazina    | 319,1 → 239,2<br>319,1 → 86    | 8,88                     |
| Levomepromazina  | 329,0 → 99,9<br>329,0 → 242    | 8,70                     |
| Tioridazina      | 371,2 → 126,1<br>371,2 → 126,1 | 9,50                     |
| Trifluoperazina  | 408,0 → 141,1<br>408,0 → 279,8 | 10,10                    |
| Amitriptilina    | 278,1 → 233,1<br>278,1 → 91    | 8,69                     |
| Nortriptilina    | 264,0 → 233,1<br>264,0 → 91    | 8,46                     |
| Imipramina       | 281,2 → 86,1<br>281,2 → 236,1  | 8,47                     |
| Desipramina      | 267,2 → 236,2<br>267,2 → 72    | 8,57                     |
| Zolpidem         | 308,2 → 263,2<br>308,2 → 235,1 | 7,02                     |
| Trazodona        | 372,2 → 176,1<br>372,2 → 148,1 | 7,40                     |
| Cocaína          | 304,1 → 182,0<br>304,1 → 82,1  | 6,95                     |
| Benzoilecgonina  | 290,2 → 168,1<br>290,2 → 150   | 5,61                     |
| Morfina          | 286,1 → 201<br>286,1 → 229     | 1,60                     |
| Codeína          | 300,1 → 215,1<br>300,1 → 199   | 5,68                     |
| 6-Acetilmorfina  | 328,2 → 211,2<br>328,2 → 193,1 | 6,10                     |

Por otro lado, se emplearon los corridos cromatográficos de los diferentes niveles en el sistema y en el método para evaluar la precisión en el tiempo de retención (TR). Es de anotar, que cuando se trabaja en cromatografía líquida los tiempos de retención pueden presentar pequeñas variaciones debido a factores como por ejemplo: composición y preparación de la fase móvil, pH, precisión de la bomba, estado de la precolumna y la estabilidad de la fase estacionaria. Más aún si se tiene en cuenta los diferentes espacios de tiempo entre la primera inyección de la validación y el corrido de la última muestra. Por esta razón, se ha preferido referenciar el tiempo de retención relativo al estándar interno (TRR) para su correcta identificación. En la tabla 4-15 se muestra el tiempo de retención para cada compuesto de la metodología analítica y el TRR al estándar interno, así como el coeficiente de variación (CV) de 35 inyecciones entre los diferentes niveles de concentración. Con los resultados obtenidos del tiempo de retención y tiempo de retención relativo, se corrobora que los criterios de identificación para el aldicarb y el carbofuran son estables puesto que presentan coeficientes de variación menores al 2,5% (SANCO/12495/2011, 2011)(SOFT / AAFS Forensic Laboratory Guidelines, 2006).

Sin embargo, para el caso del metamidofos se debe de tener especial cuidado puesto que el coeficiente de variación se sale del criterio de especificación de 2,5%. Por lo tanto, para su completa identificación se debe tener en cuenta los otros criterios mencionados tales como las transiciones características de los iones producto y la valoración de la intensidad relativa de los iones.

**Tabla 4-15:** Estabilidad del tiempo de retención y tiempo de retención relativo en el sistema y el método.

| Día | Compuesto                  | Sistema      |               |           | Método       |               |           |
|-----|----------------------------|--------------|---------------|-----------|--------------|---------------|-----------|
|     |                            | TR<br>(n=35) | TRR<br>(n=35) | C.V.<br>% | TR<br>(n=35) | TRR<br>(n=35) | C.V.<br>% |
| 1   | Aldicarb                   | 10,10        | 1,00          | 0,36      | 10,16        | 1,00          | 0,39      |
|     | Aldicab-d <sub>3</sub>     | 10,08        |               |           | 10,14        |               |           |
|     | Carbofuran                 | 10,89        | 1,00          | 0,34      | 10,92        | 1,00          | 0,37      |
|     | Carbofuran- d <sub>3</sub> | 10,91        |               |           | 10,91        |               |           |
|     | Metamidofos                | 2,00         | 1,01          | 2,73      | 2,08         | 1,01          | 2,49      |
|     | Metamidofos-d <sub>6</sub> | 1,98         |               |           | 2,06         |               |           |
| 2   | Aldicarb                   | 10,01        | 0,97          | 0,20      | 10,00        | 1,00          | 0,40      |
|     | Aldicab-d <sub>3</sub>     | 10,04        |               |           | 10,02        |               |           |
|     | Carbofuran                 | 10,86        | 1,00          | 0,39      | 10,86        | 1,00          | 0,33      |
|     | Carbofuran- d <sub>3</sub> | 10,84        |               |           | 10,84        |               |           |
|     | Metamidofos                | 1,96         | 0,99          | 2,71      | 2,07         | 0,99          | 2,68      |
|     | Metamidofos-d <sub>6</sub> | 1,98         |               |           | 2,09         |               |           |

De este modo, se concluye que la metodología analítica es selectiva para los plaguicidas aldicarb, carbofurano, metamidofos y sus respectivos estándares internos deuterados aldicarb-d<sub>3</sub>, carbofurano-d<sub>3</sub> y metamidofos-d<sub>6</sub>.

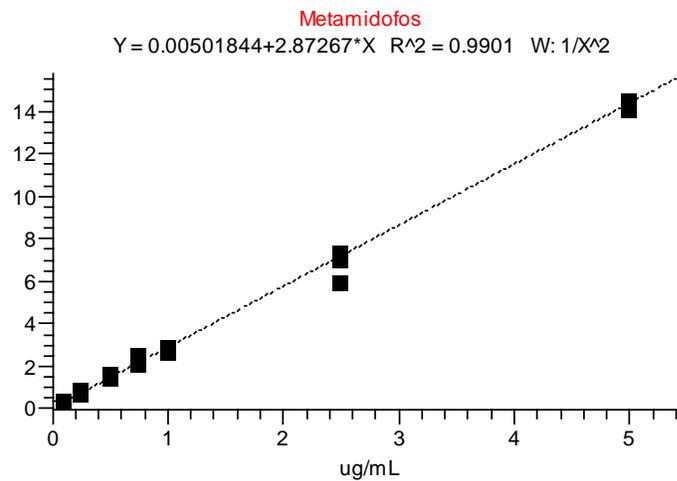
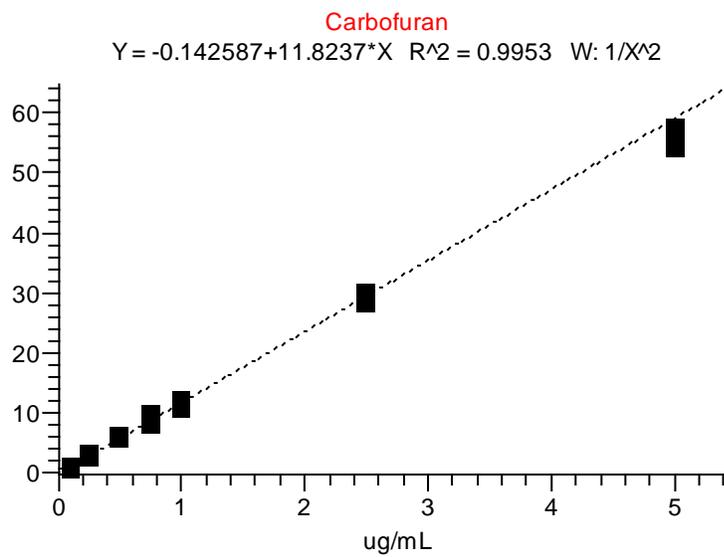
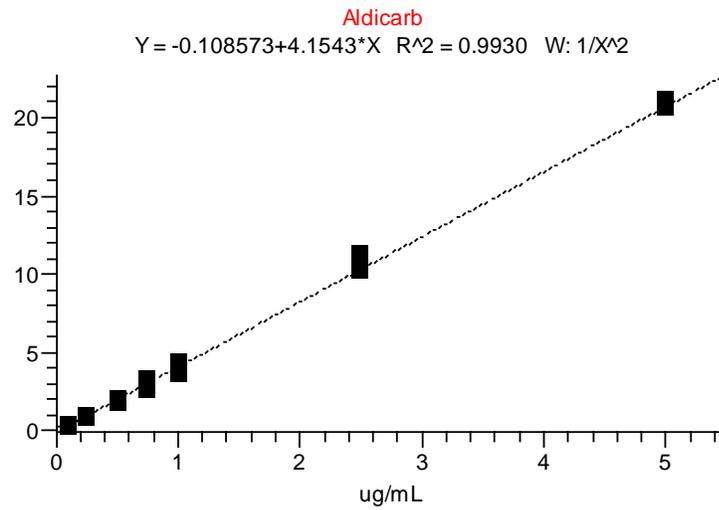
#### 4.4.2 Linealidad y rango

El rango lineal del método fue establecido entre 0,10 a 5,0 µg/mL, comienza con la concentración del límite de cuantificación LLOQ y seis concentraciones por encima de esta 0,10, 0,25, 0,50, 0,75, 1,0, 2,5 y 5,0 µg/mL para cada uno de los plaguicidas aldicarb, carbofurano y metamidofos, el día uno y el día dos tanto en el sistema como en el método. El gráfico de la curva de calibración se obtiene de la razón de área de los picos entre cada plaguicida y su respectivo estándar interno (aldicarb/aldicarb-d<sub>3</sub>, carbofurano/carbofurano-d<sub>3</sub> y metamidofos/metamidofos-d<sub>6</sub>) con respecto a la concentración (Ver anexo E).

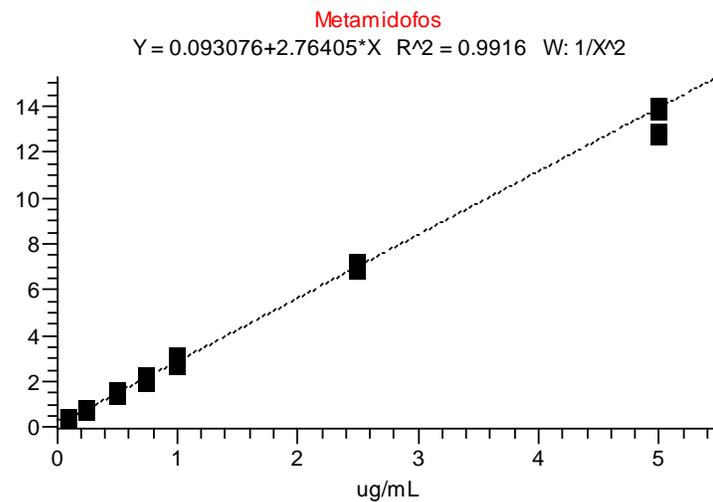
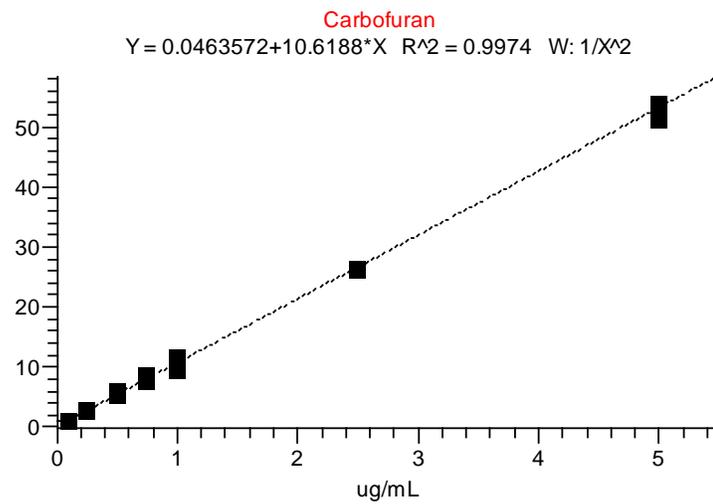
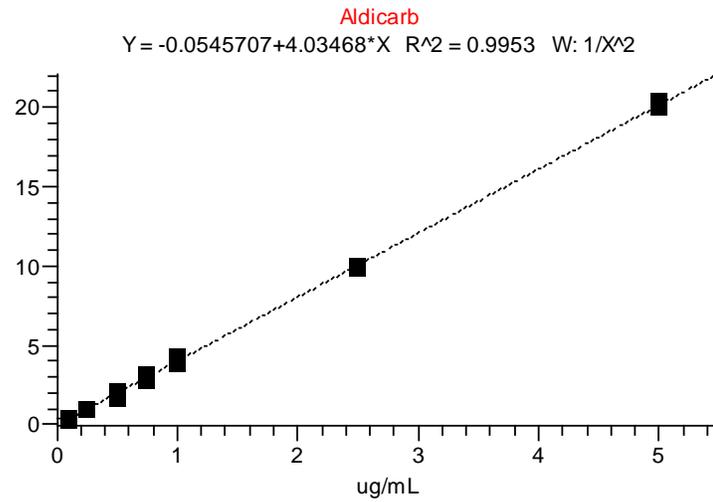
Los blancos de sangre con estándar interno y sin estándar interno no se incluyen para el cálculo del modelo matemático, pero en sí mismos establecen el control de la ausencia de interferencias en la matriz de análisis y en los estándares internos.

El modelo matemático que mejor se ajustó a los resultados obtenidos para los plaguicidas en estudio consistió en la regresión lineal ponderada  $1/x^2$  mediante el factor de la inversa del cuadrado de la concentración con respecto a la relación de áreas de cada uno de los plaguicidas con su estándar interno deuterado, consistente con datos heterocedásticos como se ha mencionado anteriormente (Almeida et al., 2002). En las figuras 4-29 y 4-30 se encuentran las rectas de regresión ponderada del modelo matemático obtenido por el *Quan Browser* del equipo LC-MS para el sistema y el método del día uno para el analista uno como ejemplo.

**Figura 4-29:** Curva de calibración en el sistema para el Aldicarb, carbofuran y metamidofos.



**Figura 4-30:** Curva de calibración en el método para el Aldicarb, carbofuran y metamidofos.



La idoneidad del modelo de calibración elegido se confirmó por los test estadísticos para la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación, además se determinaron las desviaciones estándar con sus respectivos intervalos de confianza (Anexo E). Los datos y resultados obtenidos se encuentran en las tablas 4-16, 4-17 y 4-18.

Con  $n - 2$  grados de libertad igual a 33, el  $t$  tabulado es 2,035. La prueba de hipótesis para la pendiente arrojó un  $t_m > t_{tab}$  para los tres plaguicidas en el sistema y el método, por lo tanto se rechaza la  $H_0$ , es decir las pendientes son significativamente diferentes de cero. En el caso del intercepto  $t_b < t_{tab}$ , de donde se acepta la  $H_0$ , concluyendo que el intercepto no es estadísticamente diferente de cero para los tres plaguicidas en el sistema y el método; a excepción del metamidofos en el método día 1 y el sistema en el día 2 donde  $t_b > t_{tab}$ .

En cuanto a la prueba de hipótesis para el coeficiente de correlación  $t_r > t_{tab}$ , por lo tanto se rechaza la  $H_0$ , es decir; existe correlación entre la variable del eje  $x$  correspondiente a la concentración con la variable en el eje  $y$  denominada relación de áreas. En todos los casos los coeficientes de correlación fueron superiores a 0,99 para todos los compuestos tanto en el sistema como en el método.

Cuando se observa los intervalos de confianza obtenidos entre el sistema y el método se infiere que no existen diferencias significativas en cada uno de los analitos. Se demuestra este aspecto gráficamente y desde el análisis estadístico de perfiles para los siete niveles de concentración y con la prueba de Kruskal Wallis en el ítem de precisión y exactitud. En conclusión, la metodología analítica es lineal en el rango de concentraciones entre 0,10 a 5,0  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabla 4-16:** Datos de las curvas de calibración y resultados de la pruebas de hipótesis para el intercepto, pendiente y coeficiente de correlación para el sistema y método del aldicarb.

| MÉTODO |                            |         |         |         |         |                |        | SISTEMA                    |         |         |         |         |                |       |
|--------|----------------------------|---------|---------|---------|---------|----------------|--------|----------------------------|---------|---------|---------|---------|----------------|-------|
| Día    | Parámetro                  | Valor   | Sb o Sm | LCI     | LCS     | t calculado    |        | Parámetro                  | Valor   | Sb o Sm | LCI     | LCS     | t calculado    |       |
| 1      | Pendiente                  | 4,0347  | 0,0480  | 3,9370  | 4,1324  | t <sub>m</sub> | 84,03  | Pendiente                  | 4,1543  | 0,0607  | 4,0306  | 4,2780  | t <sub>m</sub> | 68,34 |
|        | Intercepto                 | -0,0546 | 0,0088  | -0,0725 | -0,0366 | t <sub>b</sub> | -1,46  | Intercepto                 | -0,1086 | 0,0111  | -0,1313 | -0,0858 | t <sub>b</sub> | -2,29 |
|        | Coeficiente de Correlación | 0,9977  | -       | -       | -       | t <sub>r</sub> | 84,03  | Coeficiente de Correlación | 0,9965  | -       | -       | -       | t <sub>r</sub> | 68,34 |
| 2      | Pendiente                  | 4,1065  | 0,0405  | 4,0240  | 4,1890  | t <sub>m</sub> | 101,26 | Pendiente                  | 4,0887  | 0,0639  | 3,9587  | 4,2187  | t <sub>m</sub> | 63,99 |
|        | Intercepto                 | -0,0582 | 0,0075  | -0,0734 | -0,0430 | t <sub>b</sub> | -1,84  | Intercepto                 | -0,0436 | 0,0118  | -0,0676 | -0,0197 | t <sub>b</sub> | -0,88 |
|        | Coeficiente de Correlación | 0,9984  | -       | -       | -       | t <sub>r</sub> | 101,26 | Coeficiente de Correlación | 0,9960  | -       | -       | -       | t <sub>r</sub> | 63,99 |

Sb o Sm: Desviación estándar de la pendiente o el intercepto.

t<sub>m</sub>, t<sub>b</sub>, t<sub>r</sub>: Valores t calculados.

LCI: Límite de confianza inferior

LCS: Límite de confianza superior

**Tabla 4-17:** Datos de las curvas de calibración y resultados de la pruebas de hipótesis para el intercepto, pendiente y coeficiente de correlación para el sistema y método para el carbofuran.

| MÉTODO |                            |         |         |         |         |                |        | SISTEMA                    |         |         |         |         |                |       |
|--------|----------------------------|---------|---------|---------|---------|----------------|--------|----------------------------|---------|---------|---------|---------|----------------|-------|
| Día    | Parámetro                  | Valor   | Sb o Sm | LCI     | LCS     | t calculado    |        | Parámetro                  | Valor   | Sb o Sm | LCI     | LCS     | t calculado    |       |
| 1      | Pendiente                  | 10,6188 | 0,0939  | 10,4278 | 10,8098 | t <sub>m</sub> | 113,11 | Pendiente                  | 11,8237 | 0,1418  | 11,5353 | 12,1122 | t <sub>m</sub> | 83,40 |
|        | Intercepto                 | 0,0464  | 0,0173  | 0,0112  | 0,0815  | t <sub>b</sub> | 0,63   | Intercepto                 | -0,1426 | 0,0261  | -0,1957 | -0,0895 | t <sub>b</sub> | -1,29 |
|        | Coeficiente de Correlación | 0,9987  | -       | -       | -       | t <sub>r</sub> | 113,11 | Coeficiente de Correlación | 0,9976  | -       | -       | -       | t <sub>r</sub> | 83,40 |
| 2      | Pendiente                  | 10,0131 | 0,0942  | 9,8215  | 10,2047 | t <sub>m</sub> | 106,32 | Pendiente                  | 10,3714 | 0,0758  | 10,2173 | 10,5256 | t <sub>m</sub> | 136,9 |
|        | Intercepto                 | 0,0022  | 0,0173  | -0,0331 | 0,0374  | t <sub>b</sub> | 0,03   | Intercepto                 | -0,0153 | 0,0139  | -0,0437 | 0,0130  | t <sub>b</sub> | -0,26 |
|        | Coeficiente de Correlación | 0,9985  | -       | -       | -       | t <sub>r</sub> | 106,32 | Coeficiente de Correlación | 0,9991  | -       | -       | -       | t <sub>r</sub> | 136,9 |

Sb o Sm: Desviación estándar de la pendiente o el intercepto.

t<sub>m</sub>, t<sub>b</sub>, t<sub>r</sub>: Valores t calculados.

LCI: Límite de confianza inferior

LCS: Límite de confianza superior

**Tabla 4-18:** Datos de las curvas de calibración y resultados de la pruebas de hipótesis para el intercepto, pendiente y coeficiente de correlación para el sistema y método para el metamidofos.

| MÉTODO |                            |        |         |        |        |                |       | SISTEMA                    |        |         |         |        |                |       |
|--------|----------------------------|--------|---------|--------|--------|----------------|-------|----------------------------|--------|---------|---------|--------|----------------|-------|
| Día    | Parámetro                  | Valor  | Sb o Sm | LCI    | LCS    | t calculado    |       | Parámetro                  | Valor  | Sb o Sm | LCI     | LCS    | t calculado    |       |
| 1      | Pendiente                  | 2,7640 | 0,0444  | 2,6737 | 2,8544 | t <sub>m</sub> | 62,25 | Pendiente                  | 2,8727 | 0,0500  | 2,7709  | 2,9744 | t <sub>m</sub> | 57,45 |
|        | Intercepto                 | 0,0931 | 0,0082  | 0,0765 | 0,1097 | t <sub>b</sub> | 2,69  | Intercepto                 | 0,0050 | 0,0092  | -0,0137 | 0,0237 | t <sub>b</sub> | 0,13  |
|        | Coeficiente de Correlación | 0,9958 | -       | -      | -      | t <sub>r</sub> | 62,25 | Coeficiente de Correlación | 0,9950 | -       | -       | -      | t <sub>r</sub> | 27,45 |
| 2      | Pendiente                  | 2,4052 | 0,0398  | 2,3241 | 2,4862 | t <sub>m</sub> | 60,35 | Pendiente                  | 2,6515 | 0,0294  | 2,5918  | 2,7113 | t <sub>m</sub> | 90,29 |
|        | Intercepto                 | 0,1396 | 0,0073  | 0,1247 | 0,1545 | t <sub>b</sub> | 2,03  | Intercepto                 | 0,1085 | 0,0054  | 0,0975  | 0,1194 | t <sub>b</sub> | 4,74  |
|        | Coeficiente de Correlación | 0,9955 | -       | -      | -      | t <sub>r</sub> | 60,35 | Coeficiente de Correlación | 0,9980 | -       | -       | -      | t <sub>r</sub> | 90,29 |

Sb o Sm: Desviación estándar de la pendiente o el intercepto.

t<sub>m</sub>, t<sub>b</sub>, t<sub>r</sub>: Valores t calculados.

LCI: Límite de confianza inferior

LCS: Límite de confianza superior

### 4.4.3 Límites de detección LOD, inferior de cuantificación LLOQ y superior de cuantificación (ULOQ)

En la tabla 4-19 se encuentran el LOD para cada compuesto de la metodología.

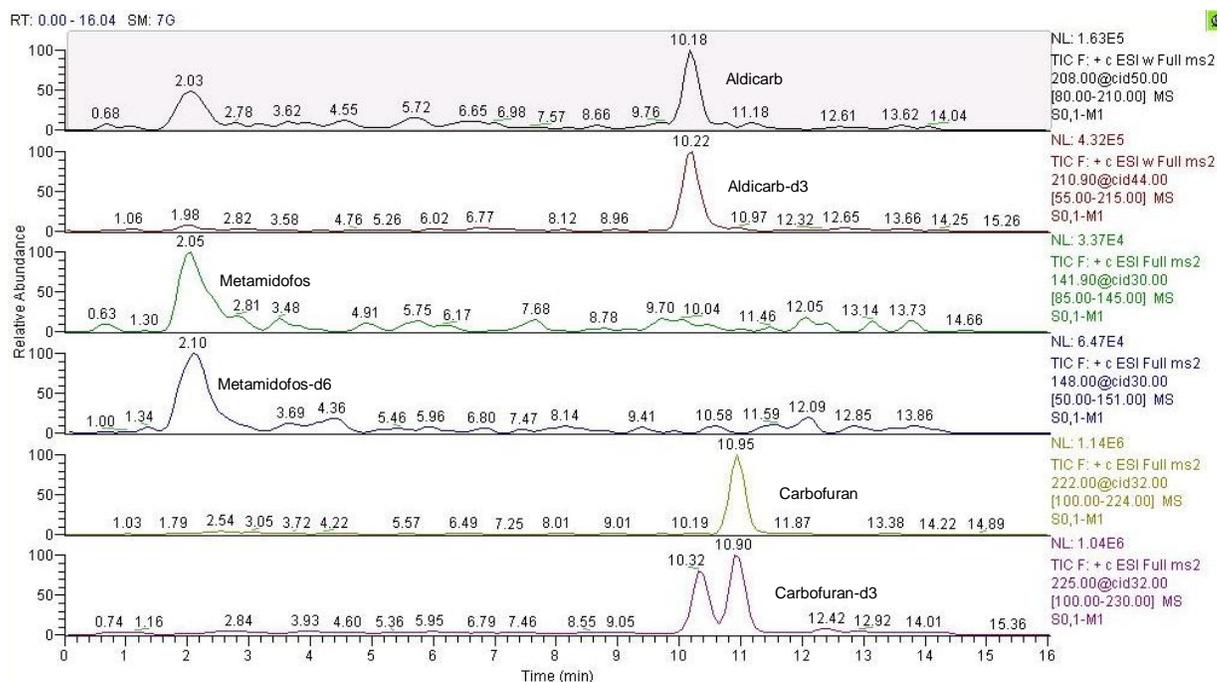
**Tabla 4-19:** Límites de detección para cada compuesto de la metodología analítica.

| Plaguicida          | LOD ( $\mu\text{g/mL}$ ) |        |
|---------------------|--------------------------|--------|
|                     | Sistema                  | Método |
| Aldicarb            | 0,010                    | 0,020  |
| Carbofuran          | 0,005                    | 0,020  |
| Metamidofos         | 0,010                    | 0,050  |
| Aldicarb – $d_3$    | 0,010                    | 0,020  |
| Carbofuran – $d_3$  | 0,005                    | 0,020  |
| Metamidofos – $d_6$ | 0,010                    | 0,050  |

Los límites de detección en el método son mayores a los obtenidos en el sistema debido al efecto matriz que ejerce los componentes inherentes de la sangre en el análisis de la muestra, entre estas acciones puede presentarse competencia en el proceso de ionización con el compuesto de interés y disminuir su detección. Básicamente el límite de detección que es usado en las aplicaciones forenses es el encontrado en el método, porque es el que se asemeja a la muestra real.

En la figura 4-31 se muestra los cromatogramas de cada plaguicida en su límite inferior de cuantificación LLOQ. Como se mencionó en el parámetro de selectividad, la sangre empleada para la validación del método presenta un pico endógeno en 10,32 minutos que no interfiere con la respuesta cromatográfica ni del espectro de masas del carbofuran- $d_3$ .

**Figura 4-31:** Cromatograma a una concentración de 0,10 µg/mL de cada uno de los plaguicidas aldicarb, carbofuran y metamidofos en sangre.



El LOQ y ULOQ para el aldicarb, carbofurano y metamidofos, se mostraran en la tabla 4-20.

#### 4.4.4 Precisión

En la tabla 4-20 se encuentran los resultados obtenidos para la precisión en el sistema y el método para cada uno de los plaguicidas, expresados en términos del coeficiente de variación CV. Para los tres compuestos en estudio se cumplieron los criterios de aceptación, correspondiente a  $CV \leq 15\%$ , excepto para el LLOQ que acepta valores de  $CV \leq 20\%$ .

**Tabla 4-20:** Precisión (repetibilidad y precisión intermedia) y exactitud en el sistema y el método para la concentración del LOQ (0,10 µg/mL), concentración baja (0,25 µg/mL), concentración media (2,50 µg/mL) y ULOQ (5,00 µg/mL).

| Analito     | Concentración (µg/mL) | Sistema             |            |                 |            |                                      |            | Método           |            |                     |            |                  |            |  |            |
|-------------|-----------------------|---------------------|------------|-----------------|------------|--------------------------------------|------------|------------------|------------|---------------------|------------|------------------|------------|--|------------|
|             |                       | Repetibilidad (n=5) |            | Exactitud (n=5) |            | Precisión Intermedia Analista (n=10) |            | Exactitud (n=10) |            | Repetibilidad (n=5) |            | Exactitud (n=10) |            | Precisión Intermedia Día Análisis (n=10) |            |
|             |                       | C.V. (%)            | M.R.E. (%) | C.V. (%)        | M.R.E. (%) | C.V. (%)                             | M.R.E. (%) | C.V. (%)         | M.R.E. (%) | C.V. (%)            | M.R.E. (%) | C.V. (%)         | M.R.E. (%) | C.V. (%)                                 | M.R.E. (%) |
| Aldicarb    | LOQ = 0,10            | 12,57               | 1,33       | 18,62           | 0,66       | 9,32                                 | 0,19       | 9,88             | 0,10       | 13,91               | 0,03       | 7,85             | -0,39      |  |            |
|             | 0,25                  | 7,76                | -2,59      | 6,56            | -1,02      | 9,41                                 | 1,97       | 4,26             | 0,56       | 3,18                | 0,65       | 4,98             | 1,64       |  |            |
|             | 2,50                  | 3,92                | 2,80       | 3,33            | 1,04       | 3,98                                 | 2,97       | 0,60             | -0,81      | 1,06                | -0,38      | 0,65             | -0,69      |  |            |
|             | ULOQ = 5,00           | 0,89                | 1,54       | 1,95            | 1,41       | 0,60                                 | 1,63       | 0,67             | 0,82       | 0,71                | 0,84       | 1,13             | 0,35       |  |            |
| Carbofuran  | LOQ = 0,10            | 7,73                | -2,15      | 7,73            | -1,66      | 5,73                                 | -1,42      | 2,82             | -0,34      | 4,64                | -0,75      | 3,61             | 0,46       |  |            |
|             | 0,25                  | 3,71                | 3,12       | 3,09            | 2,15       | 3,47                                 | 2,36       | 3,69             | -0,67      | 3,04                | 0,64       | 3,01             | -1,61      |  |            |
|             | 2,50                  | 1,85                | -0,96      | 1,61            | -1,69      | 1,25                                 | -0,90      | 0,78             | -1,39      | 0,94                | -1,41      | 2,40             | -0,24      |  |            |
|             | ULOQ = 5,00           | 2,20                | -5,07      | 2,88            | -3,46      | 3,41                                 | -2,65      | 2,09             | -1,06      | 1,62                | -1,18      | 1,67             | -1,32      |  |            |
| Metamidofos | LOQ = 0,10            | 11,88               | -1,67      | 11,30           | -1,45      | 9,45                                 | -1,50      | 12,17            | -0,99      | 9,84                | -0,25      | 13,20            | 0,36       |  |            |
|             | 0,25                  | 10,15               | 2,65       | 7,94            | 2,47       | 7,55                                 | 3,42       | 7,43             | 0,44       | 5,63                | -0,02      | 6,72             | -2,53      |  |            |
|             | 2,50                  | 8,33                | -3,71      | 5,86            | -1,99      | 5,89                                 | -2,22      | 1,91             | 0,03       | 2,02                | 0,11       | 1,63             | -0,79      |  |            |
|             | ULOQ = 5,00           | 1,28                | -0,95      | 2,93            | -1,47      | 1,10                                 | -0,81      | 4,61             | -4,94      | 4,04                | -2,51      | 3,46             | -3,46      |  |            |

**M.R.E.:** error relativo medio, porcentaje de inexactitud.

**CV:** Coeficiente de variación



Luego de observar los gráficos para este plaguicida es claro notar que no existe diferencia significativa entre los perfiles, es decir; no existe diferencia entre los resultados obtenidos entre los tres tratamientos (Para cada nivel de concentración obtenido en un mismo día por dos analistas y en dos días diferentes por un analista). Este resultado se puede verificar mediante una prueba estadística que haga el contraste de la hipótesis planteada inicialmente.

$$H_0: \mu T1 = \mu T2 = \mu T3$$

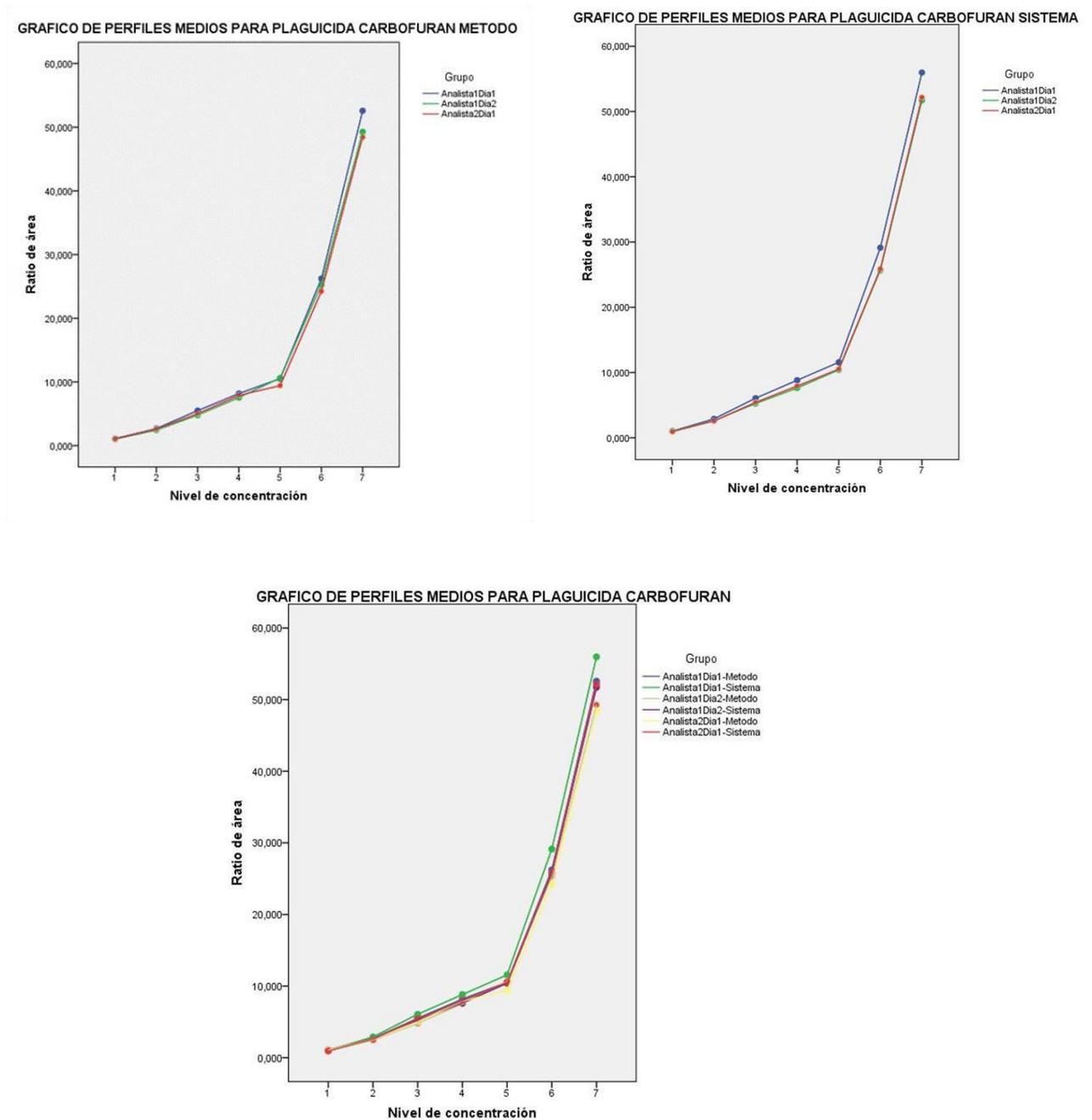
Como se planteó en la metodología se hará uso de la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. El resumen de la prueba se encuentra en la tabla 4-21.

**Tabla 4-21:** Prueba de hipótesis de Kruskal Wallis para el aldicarb

| Resumen de prueba de hipótesis |   |  |      |                            |
|--------------------------------|---|--|------|----------------------------|
|                                | Hipótesis nula  | Test   | Sig. | Decisión                   |
| 1                              | La distribución de aldicarb_met es la misma entre las categorías de tratamientos. | Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes | ,773 | Retener la hipótesis nula. |
| 2                              | La distribución de aldicarb_sis es la misma entre las categorías de tratamientos. | Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes | ,840 | Retener la hipótesis nula. |

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es .05.

Desde la tabla anterior, donde está la prueba para el método y el sistema para el aldicarb se tiene que no hay evidencia estadísticamente significativa para rechazar la hipótesis nula a un nivel de significancia de 5 %, es decir; que si comparamos los tres tratamientos planteados, no hay diferencias entre los resultados obtenidos por los dos analistas y entre dos días diferentes.

**Figura 4-33:** Gráficos de perfiles medios para el carbofuran.

Al igual que el aldicarb observado previamente, no se encuentra visualmente diferencias significativas entre los perfiles, es decir; que para la concentración de carbofuran obtenido por los dos analistas y en los dos días no hay diferencias. Resultado que se verifica mediante una prueba estadística que haga el contraste de la hipótesis. Se procede a observar los resultados de la prueba de Kruskal Wallis (Tabla 4-22).

**Tabla 4-22:** Prueba de hipótesis de Kruskal Wallis para el carbofuran.

| Resumen de prueba de hipótesis |   |  |      |                            |
|--------------------------------|---|--|------|----------------------------|
|                                | Hipótesis nula  | Test   | Sig. | Decisión                   |
| 1                              | La distribución de carbofuran_met es la misma entre las categorías de tratamientos. | Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes | ,644 | Retener la hipótesis nula. |
| 2                              | La distribución de carbofuran_sis es la misma entre las categorías de tratamientos. | Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes | ,576 | Retener la hipótesis nula. |

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es .05.

Con respecto al carbofuran, no hay evidencia estadísticamente significativa para rechazar la hipótesis nula a un nivel de significancia de 5 %. Si se compara los tres tratamientos planteados, no hay diferencias entre los análisis obtenidos por los dos analistas y en los dos días diferentes.

**Figura 4-34:** Gráficos de perfiles medios para el metamidofos.

GRAFICO DE PERFILES MEDIOS PARA PLAGUICIDA METAMIDOFOS METODO

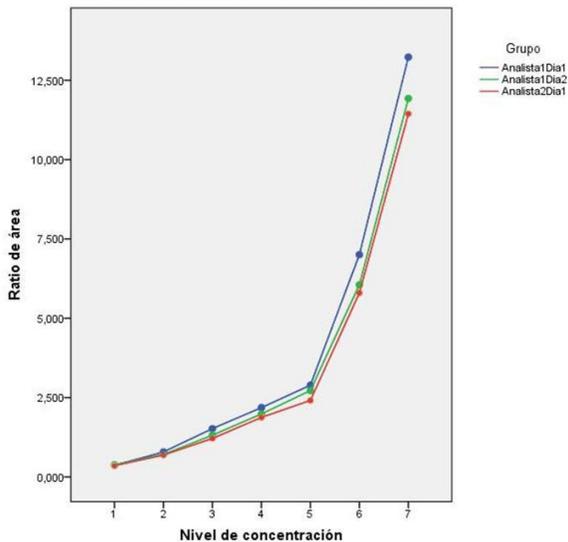
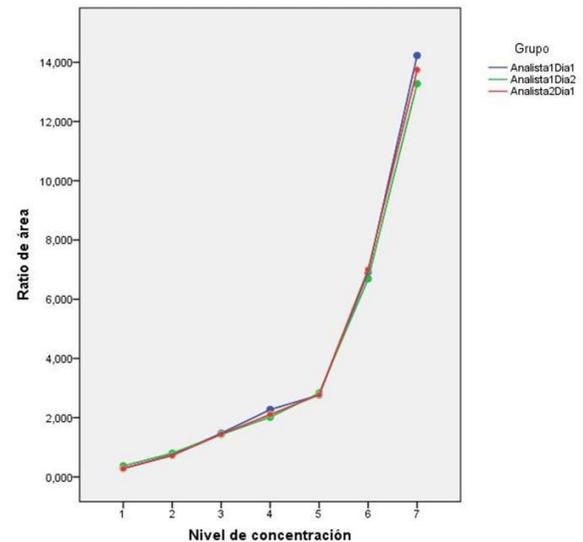
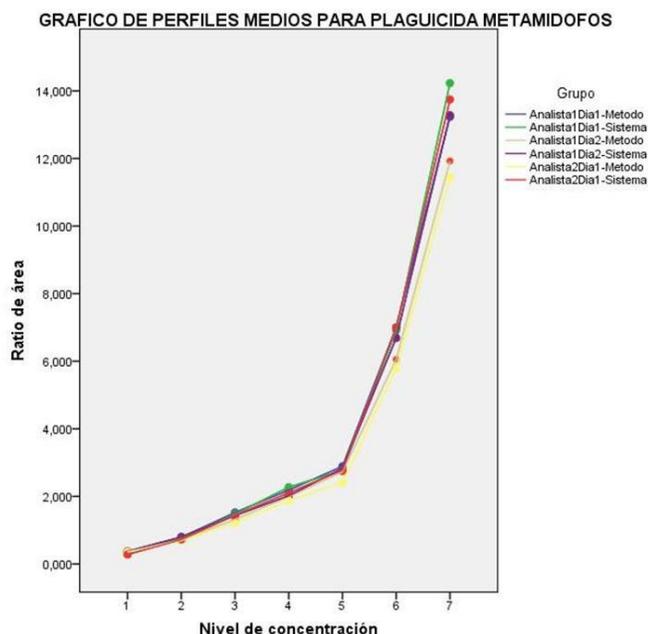


GRAFICO DE PERFILES MEDIOS PARA PLAGUICIDA METAMIDOFOS SISTEMA





El plaguicida metamidofos es tratado de igual forma que el aldicarb y carbofuran. El resultado de la prueba de de Kruskal Wallis se muestra a continuación (Tabla 4-23).

**Tabla 4-23:** Prueba de hipótesis de Kruskal Wallis para el metamidofos.

#### Resumen de prueba de hipótesis

|   | Hipótesis nula   | Test   | Sig. | Decisión                   |
|---|--|--|------|----------------------------|
| 1 | La distribución de metamidofos_met es la misma entre las categorías de tratamientos. | Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes | ,554 | Retener la hipótesis nula. |
| 2 | La distribución de metamidofos_sis es la misma entre las categorías de tratamientos. | Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes | ,429 | Retener la hipótesis nula. |

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es .05.

Si comparamos el p-valor resultado de la prueba de Kruskal Wallis para el método y para el sistema con el nivel de significancia de 5 %, se puede concluir que dado que el p-valor es mayor no existe evidencia estadísticamente para rechazar la hipótesis nula de que no hay diferencias entre los tratamientos, por lo que se puede concluir que no hay diferencias entre los análisis obtenidos por los dos analistas y en los dos días diferentes tanto para el sistema como para el método.

De los gráficos comparativos de los perfiles medios entre el sistema y el método para los tres plaguicidas, se podría concluir que al no presentarse diferencias estadísticamente significativas entre el sistema y el método es posible determinar la cantidad de un plaguicida presente en una muestra de sangre utilizando una curva preparada en el sistema. Sin embargo, para llegar a este término es importante evaluar el efecto matriz.

En resumen, con los resultados obtenidos y el análisis estadístico realizado, la metodología analítica cumple con el parámetro de precisión bajo las mismas condiciones (repetibilidad), así como en diferentes condiciones (precisión intermedia), tanto para el sistema como para el método.

#### **4.4.5 Exactitud**

La exactitud para los mismos cuatro niveles de concentración se encuentran en la tabla 4-20. En todos los casos se cumplieron los criterios de aceptación correspondiente a la concentración media entre  $\pm 15\%$  del valor nominal para la exactitud a excepción del LLOQ que acepta  $\pm 20\%$ .

#### **4.4.6 Estabilidad**

Los resultados obtenidos de estabilidad de los plaguicidas a corto plazo, largo plazo y la permanencia en el automuestreador antes de ser analizada por el equipo del nivel bajo (0,25  $\mu\text{g/mL}$ ) y alto (5,00  $\mu\text{g/mL}$ ) se encuentran en la tabla 4-24 y 4-25. La estabilidad se expresa en porcentaje (%) respecto a la media de los valores obtenidos para las muestras control.

**Tabla 4-24:** Estabilidad a corto plazo a temperatura ambiente, a largo plazo bajo a refrigeración a 4 °C y en el automuestreador a 10 °C a una concentración de 0,25 µg/mL, expresado en porcentaje (%) respecto a la media de los valores obtenidos para las muestras control.

| Condiciones de almacenamiento | Temperatura ambiente |          |          |          | Refrigeración a 4 °C |          |          |          | Automuestreador a 10 °C |        |
|-------------------------------|----------------------|----------|----------|----------|----------------------|----------|----------|----------|-------------------------|--------|
|                               | 6 horas              | 12 horas | 24 horas | 48 horas | Semana 1             | Semana 2 | Semana 3 | Semana 4 | 24 h                    | semana |
| <b>Aldicarb</b>               | 88,1                 | 96,9     | 117,1    | 82,2     | 95,6                 | 91,9     | 103,9    | 97,3     | 99,2                    | 100,9  |
| <b>Carbofuran</b>             | 81,5                 | 112,4    | 118,0    | 117,6    | 100,6                | 92,6     | 118,5    | 100,3    | 96,3                    | 94,7   |
| <b>Metamidofos</b>            | 81,5                 | 80,4     | 118,4    | 101,5    | 100,4                | ND       | ND       | ND       | 91,6                    | 88,1   |
| n = 3                         |                      |          |          |          |                      |          |          |          |                         |        |

**Tabla 4-25:** Estabilidad a corto plazo a temperatura ambiente, a largo plazo bajo a refrigeración a 4 °C y en el automuestreador a 10 °C a una concentración de 5,00 µg/mL, expresado en porcentaje (%) respecto a la media de los valores obtenidos para las muestras control.

| Condiciones de almacenamiento | Temperatura ambiente |          |          |          | Refrigeración a 4 °C |          |          |          | Automuestreador a 10 °C |        |
|-------------------------------|----------------------|----------|----------|----------|----------------------|----------|----------|----------|-------------------------|--------|
|                               | 6 horas              | 12 horas | 24 horas | 48 horas | Semana 1             | Semana 2 | Semana 3 | Semana 4 | 24 h                    | Semana |
| <b>Aldicarb</b>               | 98,9                 | 114,1    | 116,6    | 103,1    | 100,0                | 99,5     | 95,7     | 93,4     | 98,5                    | 98,1   |
| <b>Carbofuran</b>             | 110,2                | 86,6     | 84,6     | 95,2     | 98,5                 | 90,8     | 96,9     | 97,1     | 97,3                    | 97,3   |
| <b>Metamidofos</b>            | 107,4                | 93,3     | 107,9    | 93,3     | 102,7                | ND       | ND       | ND       | 88,7                    | 84,6   |
| n = 3                         |                      |          |          |          |                      |          |          |          |                         |        |

La estabilidad a corto plazo a temperatura ambiente para los plaguicidas en estudio se encuentran dentro del límite de confianza correspondiente  $>80\%$  y  $<120\%$  con respecto a la media de los valores obtenidos para las muestras de comparación, tanto a concentración baja de  $0,25 \mu\text{g/mL}$  como a concentración alta de  $5,0 \mu\text{g/mL}$ . Por lo anterior, no se afecta la concentración del plaguicida en el rango de análisis durante el tratamiento de la muestra de sangre a temperatura ambiente del laboratorio.

La estabilidad de los analitos evaluada a largo plazo evidenciaron que el aldicarb y carbofuran se encuentran dentro el límite de confianza  $>80\%$  y  $<120\%$  después de cuatro semanas. Al no mostrar cambios significativos en la concentración de estos analitos, se garantiza su estabilidad durante este periodo de tiempo.

No se detectó metamidofos en ninguna de las dos concentraciones evaluadas al cabo de una semana, ni en las subsiguientes. En consecuencia, no se garantiza la determinación del metamidofos en la muestra de sangre si la concentración inicial se encontraba en el rango de  $0,10$  a  $5,0 \mu\text{g/mL}$  almacenada a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  después de una semana. Ante este resultado, se puede considerar varios aspectos para el análisis del metamidofos en casos forenses:

- 1) Analizar lo más pronto posible (menor de una semana) la sangre de los casos que se sospecha intoxicación con este plaguicida.
- 2) Determinar el metamidofos y/o sus metabolitos en otras matrices adicionales al contenido gástrico y la sangre, tal como la orina.
- 3) Realizar estudios del metamidofos en sangre bajo otras condiciones de almacenamiento para garantizar su estabilidad, como por ejemplo a temperatura de congelación  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Existe pocos estudios de la evaluación de la estabilidad de los organofosforados en sangre. Ageda y colaboradores investigaron la estabilidad de 14 organofosforados en sangre fresca a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $4^\circ\text{C}$ , para concluir que la temperatura ejerce un gran efecto en la descomposición del organofosforado en esta matriz (Ageda et al., 2006). Advierte además que cuando se sospecha de intoxicación con organofosforados se debe

considerar que la concentración del compuesto en sangre podría decrecer durante el intervalo postmortem. Aunque en la citada publicación no se analizó el metamidofos, sus resultados soportan en gran medida los datos obtenidos de la evaluación de la estabilidad del metamidofos en el presente estudio.

La estabilidad de los plaguicidas en estudio en el automuestreador se evaluó a las 24 horas y al cabo de una semana, para esto una vez se ha desarrollado el tratamiento de la sangre, se coloca el reconstituido final en el vial de análisis y se ubica en la bandeja de muestras a una temperatura de 10 °C para ser analizada por el LC/MS. En este análisis no observaron cambios significativos en la concentración de aldicarb, carbofuran y metamidofos, por lo tanto se garantiza su estabilidad durante este periodo de tiempo en el automuestreador.

La estabilidad de los compuestos en la matriz de análisis tras someterlos a ciclos de congelado y descongelado no fue evaluada, puesto que el almacenamiento de la muestra de sangre se lleva a cabo utilizando refrigeración entre 2 y 8 °C en tubos tapa gris y no bajo congelación. Por consiguiente, cuando se analizó la estabilidad a largo plazo implícitamente también se está evaluando el proceso de atemperar las muestras, dado que el tratamiento de la muestra se realiza una vez ésta se ha retirado del refrigerador y ha alcanzado la temperatura ambiente.

#### **4.4.7 Recuperación**

Los porcentajes de recuperación medios se encuentran detallados en la tabla 4-26. Para los tres plaguicidas en estudio se encontró una recuperación mayor al 90% y coeficientes de variación menores al 8% en los niveles de concentración analizados. Estos porcentajes de recuperación obtenidos cumplen totalmente los requerimientos para metodologías bioanalíticas.

**Tabla 4-26:** Porcentaje de recuperación obtenido según el nivel de concentración para cada plaguicida.

| Plaguicida  | Concentración Nominal  |            |             |            |
|-------------|--|------------|-------------|------------|
|             | 0,10 µg/mL   | 0,25 µg/mL | 1,00 µg/mL  | 5,00 µg/mL |
|             | Porcentaje de recuperación medio (CV de la recuperación) n=5 |            |             |            |
| Aldicarb    | 96,6 (7,4)   | 95,3 (6,2) | 99,1 (6,5)  | 98,6 (1,4) |
| Carbofurano | 100,1 (4,4)  | 93,2 (2,1) | 102,0 (2,6) | 95,3 (1,3) |
| Metamidofos | 97,1 (6,7)   | 90,6 (3,4) | 98,4 (5,1)  | 92,9 (4,6) |

#### 4.4.8 Efecto matriz

El efecto matriz se evaluó por comparación de las pendientes de las curvas de calibración en presencia de la matriz sangre y por el método de la post-extracción, inicialmente se presentarán los resultados obtenidos para los métodos y luego se compararan los resultados obtenidos.

- **Método de la comparación de las pendientes de las curvas de calibración**

En la tabla 4-27 se encuentra el efecto matriz para cada plaguicida obtenida como se mencionó en la metodología de la comparación de las pendientes del método y el sistema el primer día con cada uno de los analistas y el segundo día.

**Tabla 4-27:** Efecto matriz determinado por el método de comparación de las pendientes.

| Plaguicida  | Efecto matriz (%) |            |            |
|-------------|-------------------|------------|------------|
|             | Día 1             |            | Día 2      |
|             | Analista 1        | Analista 2 | Analista 1 |
| Aldicarb    | -2,88             | -3,33      | 0,44       |
| Carbofuran  | -10,19            | -8,04      | -3,45      |
| Metamidofos | -3,78             | -19,22     | -9,29      |

### ▪ Método de la adición post-extracción

En la tabla 4-28 se encuentra el efecto matriz calculado por la ecuación descrita en la metodología para la concentración baja y alta de cada plaguicida de las seis fuentes de sangre.

**Tabla 4-28:** Efecto matriz determinado por el método de la adición post-extracción.

| Plaguicida  | Concentración                                 |               |
|-------------|---|---------------|
|             | 0,25 µg/mL                                    | 5,00 µg/mL    |
|             | Efecto matriz (%) (CV del efecto matriz) n= 6 |               |
| Aldicarb    | 17,45 (13,7)                                  | -11,37 (12,0) |
| Carbofuran  | -8,76 (13,9)                                  | -16,93 (9,0)  |
| Metamidofos | -14,75 (9,6)                                  | -14,15 (13,9) |

A la luz de los resultados de la evaluación del efecto matriz, la supresión iónica ocurre para los tres plaguicidas en estudio entre el 3 y 19%. Cuando el efecto matriz es obtenido por el método de las pendientes la supresión iónica es numéricamente menor que la obtenida por el método de la adición post-extracción a excepción del analista dos en el metamidofos que reportó un valor de -19,22%. Disminución que puede ser comprendida desde el hecho que para construir la curva de calibración en la matriz se utiliza un solo tipo de sangre en todo el rango dinámico, mientras que con él método de la post-extracción se ha empleado seis fuentes diferentes de sangre blanco. Nótese una supresión iónica para el aldicarb muy pequeña, hasta el punto de reflejar un efecto de mejora en la señal para el analista uno en el día dos.

Cuando el efecto matriz se determina por el método de la adición post-extracción, además de encontrarse una supresión iónica más pronunciada para los plaguicidas (valores de efecto matriz más negativos), se obtiene de manera opuesta una mejora de la señal con un valor de 17,45 % (valor de efecto matriz más positivo) en el nivel de concentración de 0,25 µg/mL para el aldicarb. Este valor positivo para el aldicarb en el nivel bajo, indica que los mecanismos por los que ocurre el efecto matriz en esta

concentración no suprimen la respuesta del aldicarb sino que por el contrario la mejoran o sobreestiman su respuesta, a medida que se aumenta la concentración de aldicarb hasta 5,00 µg/mL puede aumentar también la concentración de los otros compuestos inherentes de la sangre (proteínas, hormonas, lípidos, gases etc) que provocan una supresión de la señal del analito de interés.

Para los tres plaguicidas el efecto matriz es menor al  $\pm 25\%$  y el coeficiente de variación es menor al 15% cumpliendo con los criterios señalados por la Sociedad de Toxicología y Química Forense GTFCh (Peters & Remane, 2012). En consecuencia, el método cumple con los requisitos recomendados para el parámetro de la evaluación del efecto matriz en muestras forenses. Si se deseara disminuir aun más este efecto, diferentes estrategias pueden ser consideradas, entre ellas realizar procedimientos más sofisticados de preparación de muestra, sin embargo, este proceso puede ser dificultoso para métodos multi-analito.

Aunque el método de comparación de las pendientes para evaluar el efecto matriz es completamente válido y referenciado en el análisis de residuos de plaguicidas a nivel ambiental y de seguridad alimentaria (Kwon et al., 2012), a nivel de toxicología clínica y forense se recomienda tomar como mínimo cinco fuentes diferentes de matriz para examinar su incidencia en la metodología analítica. Algunos autores han involucrado hasta 105 muestras organizadas en tres sets con siete niveles de concentración y cinco fuentes diferentes de blancos de matriz por nivel (Matuszewski, Constanzer, & Chavez-Eng, 2003). Por consiguiente, el método de la post-extracción permite la evaluación cuantitativa de la magnitud y la variabilidad del efecto matriz entre las muestras de fuentes diferentes y por lo tanto, generalmente se ha preferido durante la validación, en especial de los métodos cuantitativos de nivel clínico y forense (Peters & Remane, 2012).

Finalmente, debido al efecto matriz de supresión iónica presente en el análisis de plaguicidas en sangre mediante la metodología empleada, sugiere que cuando se analicen muestras de casos forenses y se cuantifique la cantidad de plaguicida en esta matriz, efectivamente la curva de calibración debe ser preparada en sangre y no en el sistema. De lo contrario, se estaría incurriendo en un error al subestimar o sobreestimar la concentración real del plaguicida en la muestra.

#### **4.4.10 Efecto memoria (Carry over)**

De la evaluación de los blancos corridos bajo el mismo método que una muestra anterior de concentración de 5 µg/mL, se detectó pequeños picos en los tiempos de retención de los plaguicidas y los estándares internos como resultado del efecto memoria. De este modo, durante el desarrollo de la metodología se procedió a elaborar un método de lavado consistente en el monitoreo de las transiciones de cada analito del método de plaguicidas pero con un flujo de fase móvil mayor, es decir de 500 µL/min con una relación 1:1 de la fase acuosa y la fase orgánica que permita arrastrar los residuos de plaguicidas presentes.

Para asegurar la disminución del efecto memoria, se programó en todas las secuencias el corrido de mínimo dos inyecciones de metanol después de cada muestra. El primero bajo el método de lavado y el segundo con el método de plaguicidas.

Aunque siempre se debe correr mínimo dos inyecciones de metanol antes de la próxima muestra para minimizar el efecto memoria con los métodos anteriormente mencionados, es importante manifestar que para el estudio de muestras de casos forenses su inyección en lo posible no debe ser aleatorio. En este sentido, si un caso cuenta con muestras de contenido gástrico y sangre, y el contenido gástrico previamente ha reportado un positivo por la técnica GC/MS, la muestra de sangre debe ser inyectada de último por LC/MS puesto que generalmente se espera tener una concentración alta del plaguicida.

#### **4.4.11 Intensidad relativa de los iones**

El valor medio de la intensidad relativa de las transiciones monitorizadas para todos los plaguicidas en la sangre y el CV de los valores obtenidos en dos días diferentes, cuatro concentraciones distintas y cada día con cinco réplicas se encuentran en la tabla 4-29.

**Tabla 4-29:** Intensidad relativa de iones.

| Plaguicida  | Concentración Nominal |              |              |              |
|---|-----------------------|--------------|--------------|--------------|
|   | 0,10 µg/mL            | 0,25 µg/mL   | 1,00 µg/mL   | 5,00 µg/mL   |
| Media de la razón (intensidad transición cuantificadora/intensidad transición cualificadora) (CV de la intensidad relativa de iones) n=10 |                       |              |              |              |
| Aldicarb  | 20,88 (13,42)         | 21,18 (9,20) | 21,90 (7,55) | 21,21 (4,84) |
| Carbofurano   | 51,33 (9,84)          | 49,34 (6,12) | 48,20 (5,77) | 52,44 (4,62) |
| Metamidofos   | 1,94 (10,43)          | 1,92 (9,04)  | 2,02 (6,73)  | 1,93 (6,41)  |

Los valores de CV estuvieron comprendidos entre el 4,62 y 13,42% para los tres plaguicidas en estudio, resultados que cumplen con la tolerancia máxima permitida de  $\pm$  20% cuando la intensidad relativa (% del pico de base) es mayor al 50% como sucede para el aldicarb, carbofurano y metamidofos (SANCO/12495/2011, 2011)(SOFT / AAFS Forensic Laboratory Guidelines, 2006). Estos resultados señalan la utilidad de este parámetro como criterio de identificación adicional al tiempo de retención y la presencia de las dos transiciones para cada compuesto.

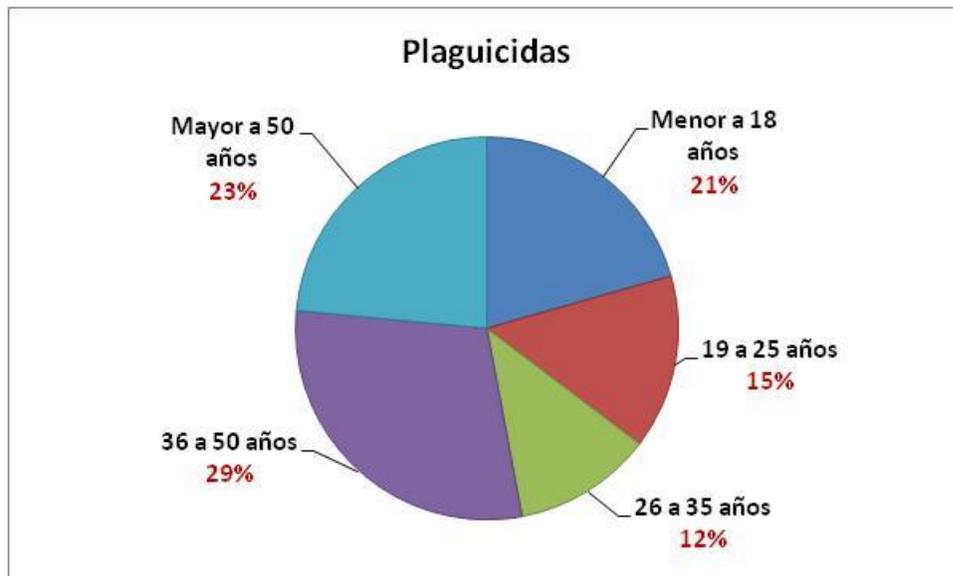
## 4.5 Aplicación de la metodología al análisis de muestras reales

### 4.5.1 Distribución socio-demográfica

A continuación se presenta la distribución demográfica descriptiva de 34 casos reales remitidos al Laboratorio de Toxicología del Instituto Nacional de Medicina Legal de la ciudad de Bogotá durante el último trimestre del 2012 provenientes de la ciudad de Bogotá y los departamentos de Cundinamarca y Boyacá (Anexo F).

#### ▪ Distribución porcentual de muertes por aldicarb, carbofuran y metamidofos según la edad

En la figura 4-35 se expresa la distribución porcentual de muertes asociada a los plaguicidas en estudio según la edad de los occisos de los casos analizados.

**Figura 4-35:** Porcentaje de occisos asociados a plaguicidas por grupos de edad.

De este estudio, se observa que las muertes por estos tres plaguicidas se encuentran distribuidos en todo el rango de edad, con un pequeño porcentaje mayor en la población entre los 36 y 50 años (29%), grupo etario más vulnerable a perder la vida por esta causa. Le sigue con porcentajes muy cercanos los mayores de 50 años (23%) y los menores a 18 años (21%).

#### ▪ **Distribución porcentual de muertes por aldicarb, carbofuran y metamidofos según el género**

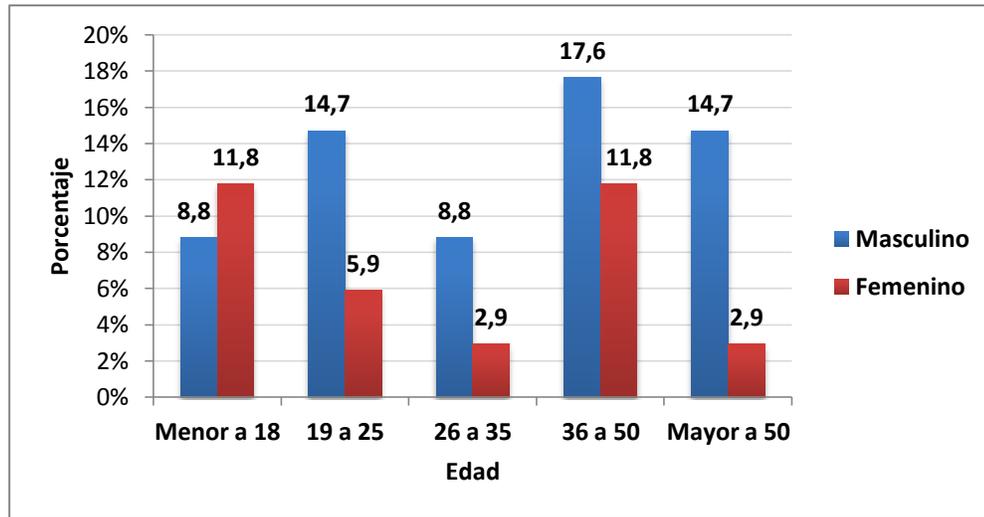
La distribución porcentual de muertes por los plaguicidas en estudio según el género se observa en la figura 4-36, este fenómeno ocurrió en un porcentaje mayor para hombres (65%) que en mujeres (35%). De esta manera, se puede establecer que para el periodo de tiempo analizado y de los 34 casos, la muerte asociada por los plaguicidas aldicarb, carbofuran o metamidofos se presentó de dos hombres por cada mujer.

**Figura 4-36:** Distribución porcentual de muertes asociadas a los plaguicidas en estudio según el género.



Dentro de los casos analizados, el número de occisos por aldicarb, carbofuran y metamidofos es mayor tanto en hombres como en mujeres en el intervalo de 36 a 50 años (con 17,6 y 11,8%) (Figura 4-37). La tendencia en mujeres es decreciente en el número de muertes desde el intervalo de edad menor a 18 años (11,8%) hasta el intervalo de 26 a 35 años, con un ascenso en el intervalo de 36 a 50 años. La tendencia en los hombres es creciente desde menor a 18 años hasta el intervalo de 19 a 25 y decrece en el intervalo de 26 a 35 años. Aunque el porcentaje de hombres en esta investigación sobrepasa al de las mujeres, se debe de tener especial cuidado para concluir que este género es más vulnerable a la intoxicación fatal por los plaguicidas en estudio, para ello, es necesario realizar un estudio más amplio en el tiempo y utilizar una muestra estadísticamente representativa que permita analizar en términos de tasas las muertes de hombres y mujeres por esta causa. Puesto que es conocido, que en general en Colombia hay un mayor número de muertes del género masculino que el femenino asociadas a todas las causas de muerte que incluyen entre otras, el proyectil de arma de fuego y el ahorcamiento (Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses., 2012).

**Figura 4-37:** Relación de muertes asociados a los plaguicidas en estudio según el género y edad.

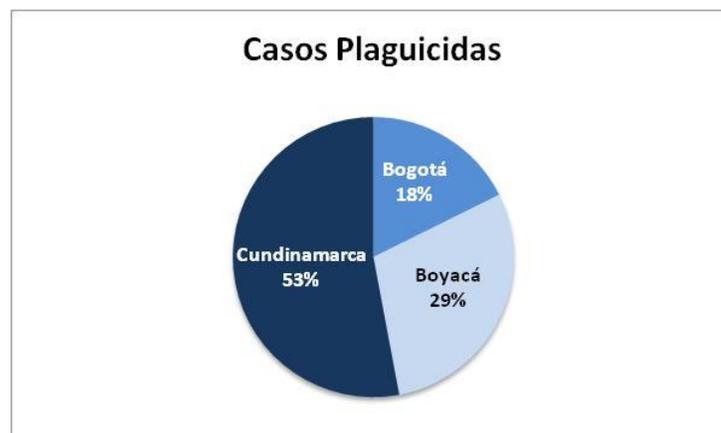


#### 4.5.2 Distribución geográfica

##### ▪ Distribución porcentual de muertes por aldicarb, carbofuran y metamidofos según el lugar de procedencia

De este estudio, en cuanto al lugar de procedencia, el mayor número de muertes por intoxicación por aldicarb, carbofuran y metamidofos fue en Cundinamarca (53%), seguido por Boyacá (29%) y Bogotá (18%) (Figura 4-38).

**Figura 4-38:** Distribución porcentual de muertes asociados aldicarb, carbofuran y metamidofos según el lugar de procedencia analizados.



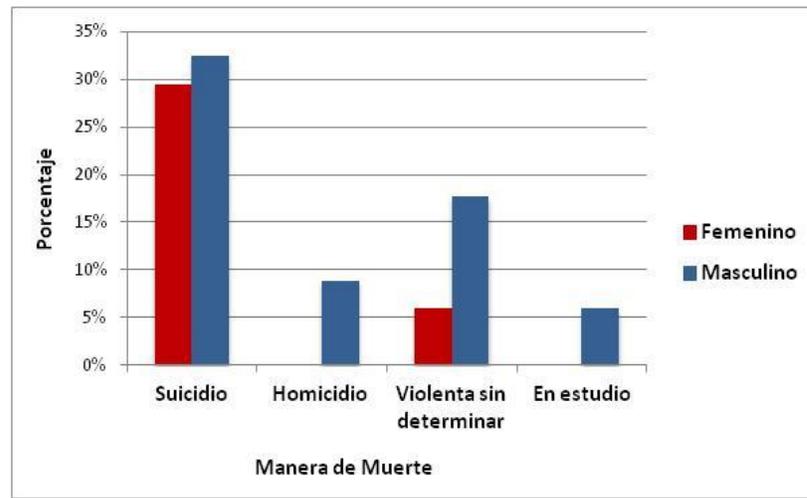
### 4.5.3 Distribución según características del hecho

#### ▪ Distribución porcentual de muertes por aldicarb, carbofuran y metamidofos según la manera de muerte

Dentro de los casos estudiados, el 62% de los occisos fue catalogado como manera de muerte el suicidio, el 23% violenta sin determinar, el 9% homicidio y el 6% en estudio (Figura 4-39). En relación con el género, se observa que los hombres sobresalen en las cuatro maneras de muerte, sin embargo, las mujeres representan un porcentaje importante en el suicidio 29% frente al 34% de los hombres. Además las mujeres también se relacionan con las muertes violentas sin determinar (6%), para los hombres corresponde el (18%). El fenómeno del homicidio utilizando los plaguicidas en estudio se encuentra relacionado con los hombres (9%) y las muertes en estudio igualmente con este género (6%) (Figura 4-40).

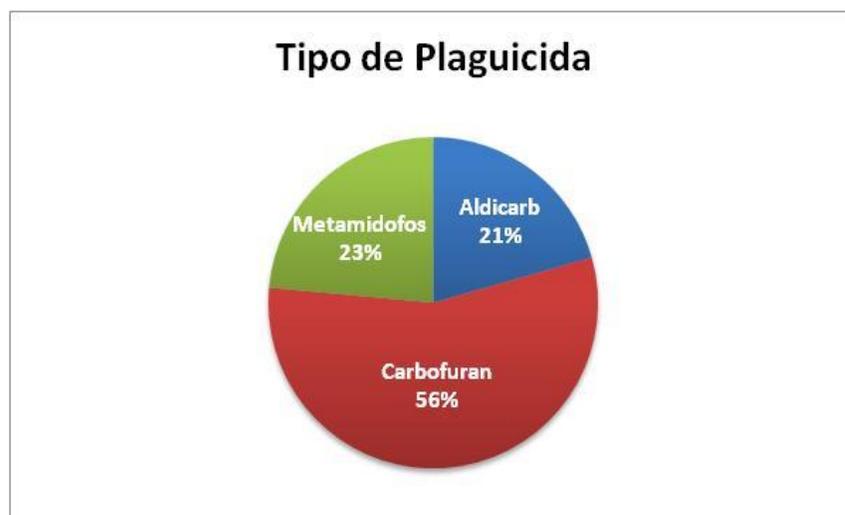
**Figura 4-39:** Porcentaje de occisos asociados a los plaguicidas en estudio de acuerdo a la manera de muerte.



**Figura 4-40:** Relación de occisos de acuerdo a la manera de muerte y el género.

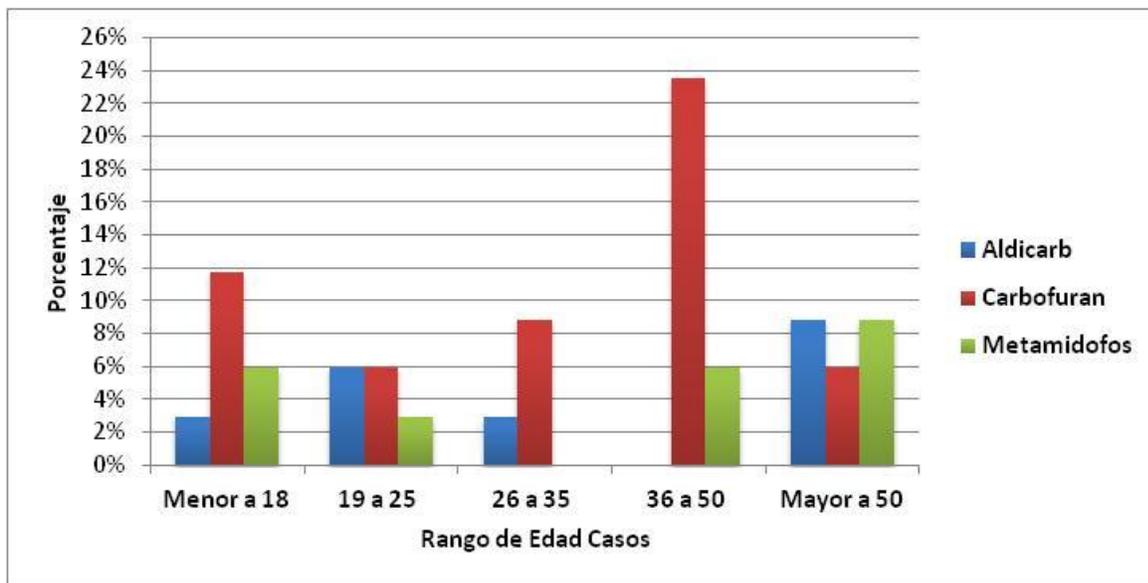
#### ▪ Distribución porcentual de muertes según el plaguicida asociado

De las muestras del presente estudio, el carbofuran preside como el plaguicida asociado al mayor número de intoxicaciones letales totales (56%), seguido por el metamidofos (23%) y el aldicarb (21%) (Figura 4-41).

**Figura 4-41:** Distribución porcentual de muertes asociados al tipo de plaguicida.

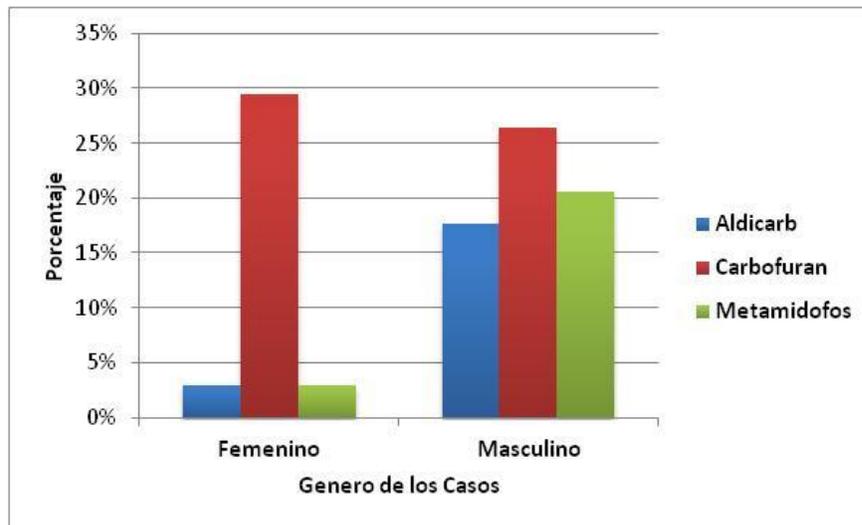
Llama la atención que el plaguicida más utilizado por el grupo etario que más presenta intoxicaciones fatales comprendido entre los 36 y 50 años es el carbofuran (24%) seguido por el metamidofos (6%), mientras que los mayores a 50 años han utilizado casi proporcionalmente el aldicarb (9%) y el metamidofos (9%) y en menor proporción el carbofuran (6%) (Figura 4-42)

**Figura 4-42:** Relación de muertes asociadas según el plaguicida y rango de edad.



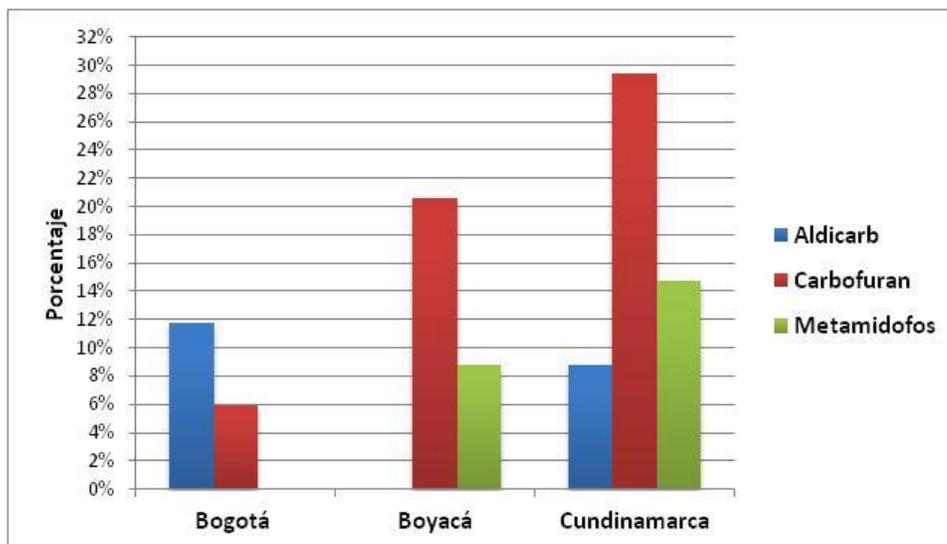
#### ▪ Distribución porcentual de muertes según el plaguicida asociado y el género

En el presente estudio, el carbofuran es el plaguicida más asociado a las muertes en hombres (26%) y mujeres (29%), seguido por el metamidofos en el caso de los hombres (21%) y el aldicarb (18%) con respecto al metamidofos (3%) y del aldicarb (3%) en mujeres figura 4-43.

**Figura 4-43:** Relación de muertes asociados según el plaguicida y el género.

#### ▪ **Distribución porcentual de muertes según el plaguicida asociado y el lugar de procedencia**

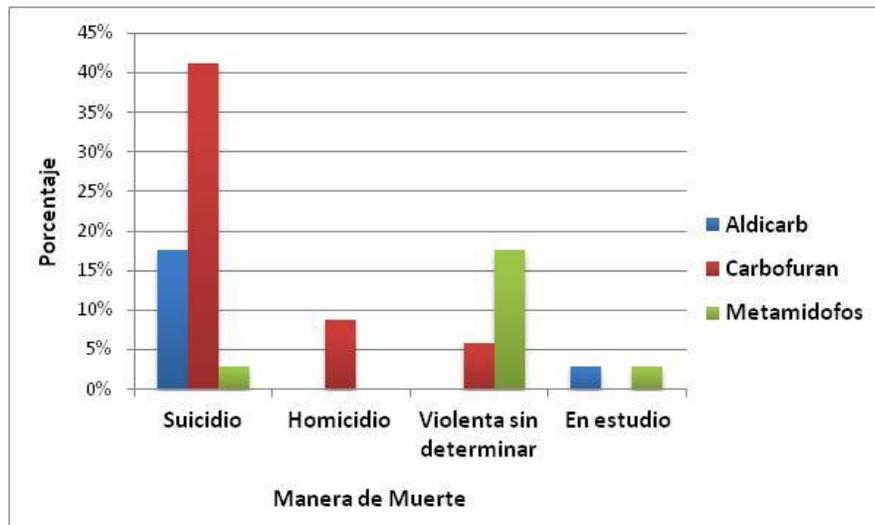
De acuerdo al lugar de procedencia, de las muestras del presente en estudio se observa que en Bogotá el aldicarb se encuentra en mayor frecuencia (12%) seguido por el carbofuran (6%). En Cundinamarca el carbofuran presenta la mayor cifra de intoxicación fatal (29%) seguido por el metamidofos (15%) y aldicarb (9%). En el caso de Boyacá se destaca igualmente el carbofuran (21%) seguido por el metamidofos (9%) (Figura 4-44). En el Departamento de Boyacá no se encontraron casos asociados al aldicarb y en Bogotá asociados a metamidofos.

**Figura 4-44:** Relación de muertes asociados a cada plaguicida y el lugar de procedencia.

- **Distribución porcentual de muertes según el plaguicida asociado y la manera de muerte**

De las muestras analizadas, el plaguicida involucrado en el fenómeno del suicidio es el carbofuran (41%) seguido por el aldicarb (18%) y el metamidofos (3%). Las muertes violentas sin determinar son lideradas por el metamidofos (18%), seguido del carbofuran (6%). En el caso del homicidio se encuentra asociado totalmente el carbofuran (9%). Las muertes en estudio vienen asociadas con el aldicarb y metamidofos en porcentajes iguales del 3% (Figura 4-45).

**Figura 4-45:** Relación de occisos de acuerdo a la manera de muerte y el plaguicida asociado.



### 4.5.3 Análisis de muestras forenses

#### ▪ Análisis de sangre y hallazgos post-mortem

La metodología analítica desarrollada y validada en el presente trabajo se aplicó como técnica para la determinación cuantitativa de los plaguicidas aldicarb, carbofuran y metamidofos en muestras de sangre post-mortem provenientes de 34 casos reales remitidos al Laboratorio de Toxicología del Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la Regional Bogotá durante el último trimestre del 2012.

En la tabla 4-30 se presentan los resultados obtenidos del análisis de las muestras de sangre y los principales hallazgos post-mortem de interés toxicológico de los casos analizados y de los cuales la información se encontraba disponible. Aquellos valores de concentración que se encuentran por encima del límite de detección del plaguicida pero por debajo del límite de cuantificación se reporta como menor a 0,10 µg/mL. Así mismo, la concentración de plaguicida superior al límite superior de cuantificación se reporta como mayor a 5,00 µg/mL.

**Tabla 4-30:** Casos forenses asociados con los plaguicidas en estudio del último trimestre del 2012.

| <b>Aldicarb</b> |                                |  |  |
|-----------------|--------------------------------|--|--|
| <b>Caso No.</b> | <b>Concentración<br/>µg/mL</b> | <b>Hallazgo</b>  | <b>Receptor afectado</b>   |
| <b>1</b>        | 1,90<br>1,84                   | Sin información  | N/A  |
| <b>2</b>        | 0,25<br>0,23                   | Occiso con ausencia de signos externos de trauma, fenómenos cadavéricos tempranos, sin signos de atención médica, signos inespecíficos de hipoxia.   | Síndrome muscarínico con afectación de pulmones – bronquios.                 |
| <b>3</b>        | 0,82<br>0,79                   | Al examen interno como único hallazgo relevante se evidenció congestión visceral generalizada, no se encuentran signos macroscópicos de alteración orgánica, vascular o de otra índole asociados. Con la información aportada por el acta de inspección y los hallazgos de necropsia no se puede concluir el mecanismo de muerte para este caso, por lo cual se toman muestras de tejidos y fluidos corporales para ser analizados por parte de los laboratorios de patología y toxicología respectivamente, reportes que posteriormente complementarán este informe pericial. | Síndrome muscarínico con afectación del sistema gastrointestinal.            |
| <b>4</b>        | 0,12<br>0,12                   | Joven masculino con signos de intervención médica, procede de hospital, los hallazgos de necropsia médico legal presenta signos inespecíficos de hipoxia como cianosis facial y petequias en conjuntivas. El examen interno revela órganos con congestión visceral marcada, estomago con mucosa hemorrágica y edematosa.   | Síndrome muscarínico con afectación del sistema gastrointestinal y pulmones. |
| <b>5</b>        | 0,30<br>0,27                   | Cadáver de un hombre adulto joven, quien muestra coloración violácea de los labios, compatible con quemadura química. Edema cerebral, edema pulmonar,  | Síndrome muscarínico con afectación del sistema gastrointestinal y pulmones. |

|                   |                     | gastritis erosiva aguda y congestión generalizada de los órganos.   |  |
|-------------------|---------------------|---|--|
| 6                 | 0,47<br>0,49        | Hipoxia dada por congestión generalizada, fluidez y oscurecimiento hemáticos y abundante líquido espumoso rojizo en los pulmones.   | Síndrome muscarínico con afectación del sistema gastrointestinal y pulmones.   |
| 7                 | ND                  | Paciente que ingresa al centro médico diaforética, taquicardia, miosis, contracción de los músculos faciales, debilidad, con deterioro progresivo de la respiración, saturación del 50%. Paro cardiorespiratorio.   | Síndrome muscarínico con afectación del sistema gastrointestinal, sistema cardiovascular, glándulas exocrinas y pulmones.<br>Síndrome nicotínico |
| <b>Carbofuran</b> |                     |   |  |
| Caso No.          | Concentración µg/mL | Hallazgo  | Receptor afectado  |
| 8                 | Mayor a 5,0         | Los hallazgos de necropsia describen una posible intoxicación exógena debido a edema de hígado, bazo, intestino delgado y grueso.   | Síndrome muscarínico con afectación del sistema gastrointestinal.  |
| 9                 | 0,78<br>0,75        | Sin información   | N/A  |
| 10                | 2,62<br>2,65        | Sin información   | N/A  |
| 11                | 1,30<br>1,40        | La occisa presenta signos de hipoxia generalizada, edema pulmonar y ausencia de traumas recientes tanto externa como internamente.  | Síndrome muscarínico con afectación de pulmones – bronquios.   |
| 12                | Menor a 0,10        | Sin información   | N/A  |
| 13                | 2,89<br>2,82        | El examen externo presenta secreción mucoide moderada por fosas nasales. Presencia de secreción espumosa escasa en laringe, tráquea, además de secreción escasa en esófago, así como pulmones congestivos y hemorrágicos. Al parecer fallece por insuficiencia respiratoria aguda, secundaria a posible intoxicación exógena. | Síndrome muscarínico con afectación del sistema gastrointestinal, sistema cardiovascular, glándulas exocrinas y pulmones.                        |
| 14                | 1,46<br>1,46        | Hongo de espuma en la boca, pupilas mióticas, congestión visceral, contenido gástrico de olor inespecífico y aspecto oleoso   | Síndrome muscarínico con afectación del sistema gastrointestinal y pulmones.   |

|    |              |   |  |
|----|--------------|---|--|
|    |              | edema pulmonar severo. Fenómenos cadavéricos tempranos.   | Síndrome nicotínico.   |
| 15 | Mayor a 5,0  | Ingresa al centro médico en paro cardiorespiratorio, pupilas puntiformes, contracciones musculares. A pesar de manejo con vasopresores, persiste hipotensa, en falla respiratoria. Hematoma subgaleal y edema de mano izquierda. Hemorragia subaracnoidea, edema cerebral, falla ventilatoria, contusión pulmonar post reanimación y consumo de colinesterasas. Deterioro del estado general. | Síndrome muscarínico con afectación del sistema gastrointestinal, sistema cardiovascular, glándulas exocrinas y pulmones.<br><br>Síndrome nicotínico |
| 16 | Menor a 0,10 | Hongo de espuma, triada de las asfixias (petequias en serosas, fluidez sanguínea y aumento de los pesos de los órganos por congestión visceral generalizada) Secreciones abundantes en tráquea, pulmones y bronquios. Pupilas puntiformes.  | Síndrome muscarínico con afectación del sistema gastrointestinal, sistema cardiovascular, glándulas exocrinas y pulmones.<br><br>Síndrome nicotínico |
| 17 | 0,16<br>0,17 | Se trata de un fallecido masculino que presenta: ausencia de lesiones externas traumáticas, signos inespecíficos de hipoxia, edema pulmonar, coleditiasis. Sin intervención médica.   | Síndrome muscarínico con afectación de pulmones.<br><br>Síndrome nicotínico  |
| 18 | 1,58<br>1,63 | Pupilas puntiformes, ingurgitación yugular congestión pulmonar y líquido de edema en parénquima pulmonar. Fallece por falla ventilatoria aguda secundaria a edema pulmonar ocasionado por intoxicación exógena.   | Síndrome muscarínico con afectación de pulmones<br><br>Síndrome nicotínico   |
| 19 | Menor a 0,10 | De los hallazgos de necropsia y la información aportada por la autoridad no hay elementos de juicio suficientes para referir la causa de muerte. Por lo cual se concluirá con los resultados del laboratorio de toxicología e histopatología.   | N/A  |
| 20 | 2,42<br>2,32 | Fenómenos cadavéricos tempranos, huella de venopunción radial derecha e   | Síndrome muscarínico con afectación de sistema gastrointestinal.   |

|                    |                     | izquierda. Congestión visceral abdominopelvica.  |  |
|--------------------|---------------------|--|--|
| 21                 | 4,10<br>4,31        | Occisa que presenta cianosis facial y ungueal. Ingurgitación yugular bilateral, petequias en cuero cabelludo, el epicardio y en pleura visceral. Congestión vascular generalizada, contenido gástrico con fuerte olor a químico de color negruzco.   | Síndrome muscarínico con afectación del sistema gastrointestinal, glándulas exocrinas y pulmones.<br>Caracterización de olor a un tóxico.<br>Síndrome nicotínico |
| 22                 | 1,65<br>1,62        | Sin información  | N/A  |
| 23                 | 2,61<br>2,63        | Cianosis labial y ungueal, petequias múltiples en la galea, espuma rosada de pequeña burbuja en orofaringe, tráquea y bronquios. Petequias múltiples en epicardio y en la pleura visceral de ambos pulmones. Mucosa gástrica hemorrágica y congestión visceral generalizada.   | Síndrome muscarínico con afectación del sistema gastrointestinal y pulmones.<br><br>Síndrome nicotínico.   |
| 24                 | 0,99<br>1,00        | Sin información  | N/A  |
| 25                 | Menor a 0,10        | Mujer adulta madura sin huellas externas de violencia con edema cerebral, edema pulmonar, adherencias fibrosas pleuroparietales derechas y congestión visceral generalizada.   | Síndrome muscarínico con afectación del sistema gastrointestinal y pulmones.<br><br>Síndrome nicotínico  |
| 26                 | Menor a 0,10        | Se trata del cadáver de una mujer adulta que al parecer según el acta intenta cortar las venas de la muñeca e ingiere sustancias desconocidas para suicidarse con: heridas en la muñeca de vacilación, cianosis de la cara y cuello, congestión visceral marcada, tumor adyacente a la capsula suprarrenal derecha y nasorragia. | Síndrome muscarínico con afectación del sistema gastrointestinal y pulmones.<br><br>Síndrome nicotínico  |
| <b>Metamidofos</b> |                     |  |  |
| Caso No.           | Concentración µg/mL | Hallazgo   | Receptor afectado  |
| 27                 | ND                  | Sin información  | N/A  |
| 28                 | ND                  | Sin información  | N/A  |
| 29                 | ND                  | Sin información  | N/A  |
| 30                 | ND                  | Hombre adulto maduro, sin huellas externas de violencia,   | Síndrome muscarínico con afectación del  |

|  |             |   |   |
|--|-------------|---|---|
|  |             | fenómenos cadavéricos tempranos, congestión visceral generalizada, fluidez sanguínea al corte de órganos, antracosis moderada y edema pulmonar.   | sistema gastrointestinal y pulmones.<br>Síndrome nicotínico   |
| <b>31</b>  | ND          | Signos inespecíficos de hipoxia dados por: petequias pleurales, congestión marcada de órganos, fluidez sanguínea evidente, huella de venopunción en miembro superior izquierdo como único signos de atención medica, gran congestión de la mucosa gástrica y esofágica, edema cerebral y pulmonar evidente. | Síndrome muscarínico con afectación del sistema gastrointestinal, sistema cardiovascular y pulmones.<br>Síndrome nicotínico |
| <b>32</b>  | ND          | Cianosis en cara y en cuello ingurgitación yugular. Signos de edema cerebral, calcificación de arteria cerebral, adherencias pleurales, congestión pulmonar y mucosa gástrica hiperemia.  | Síndrome muscarínico con afectación del sistema gastrointestinal, sistema cardiovascular y pulmones.<br>Síndrome nicotínico |
| <b>33</b>  | mayor a 5,0 | Sin información   | N/A   |
| <b>34</b>  | ND          | Sin información   | N/A   |
| N/A: No aplica puesto que no hay información suficiente. |             |   |   |

Las conclusiones que pueden derivarse de los resultados y hallazgos de la tabla 4-30 son las siguientes:

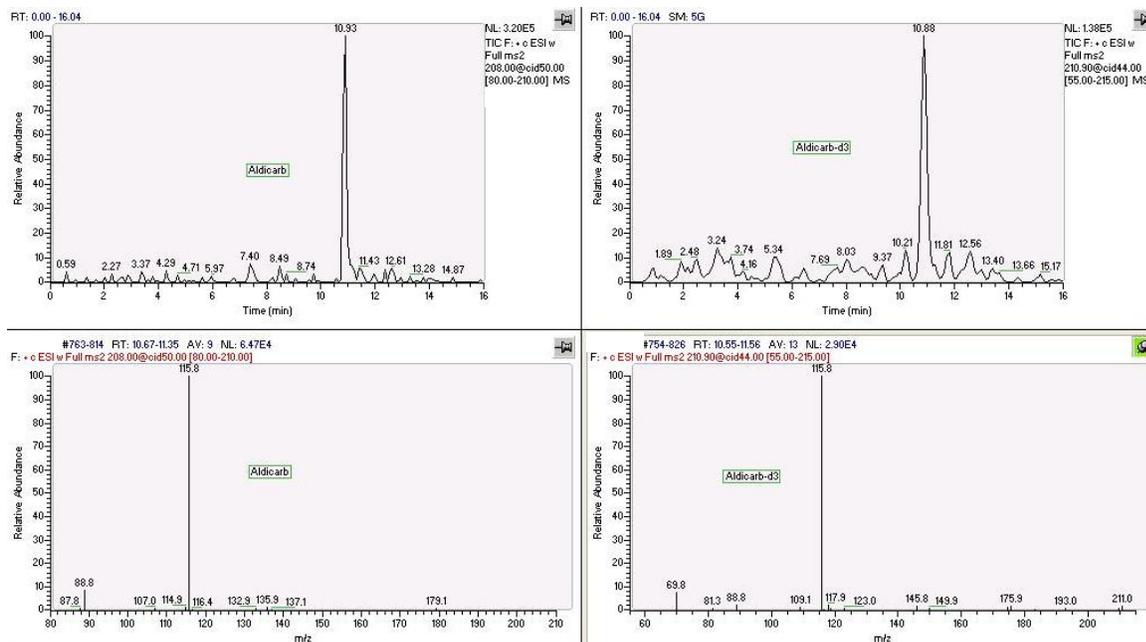
- Los casos (2, 4, 5, 7, 11, 13, 14, 15, 16,17, 18, 21, 23, 25, 26 y 32) describe los hallazgos externos del occiso que son compatibles con los signos de asfixia, congestión de la cara, cianosis en labios, nariz y dedos.
- Los casos (3, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 14,16,17, 18, 20, 21, 23, 25, 26, 30, 31 y 32) dentro de su descripción incluye los hallazgos internos del occiso que se resumen en mucosa gástrica congestionada y hemorrágica, congestión pulmonar, edema pulmonar hemorrágico, y petequias subpleural. Cerebro hinchado y una congestión visceral generalizada.
- El caso 21 es un ejemplo de la descripción de la presencia de un olor característico enunciado como “químico” en el contenido gástrico.
- Los casos (1, 9, 10, 12, 19, 22, 24, 27, 28, 29, 33 y 34) que corresponden al 35,3% de los casos, no contienen ninguna información de la necropsia que hubiese permitido el abordaje del caso hacia el análisis de plaguicidas. En efecto,

cuando llegaron al Laboratorio de Toxicología inicialmente se les realizó otros análisis como alcoholemia, drogas de abuso, depresores del sistema nervioso central, entre otros. Afortunadamente la muestra de sangre no se agotó en el desarrollo de estos análisis y se logró responder a la posible causal de muerte con el resultado del plaguicida encontrado.

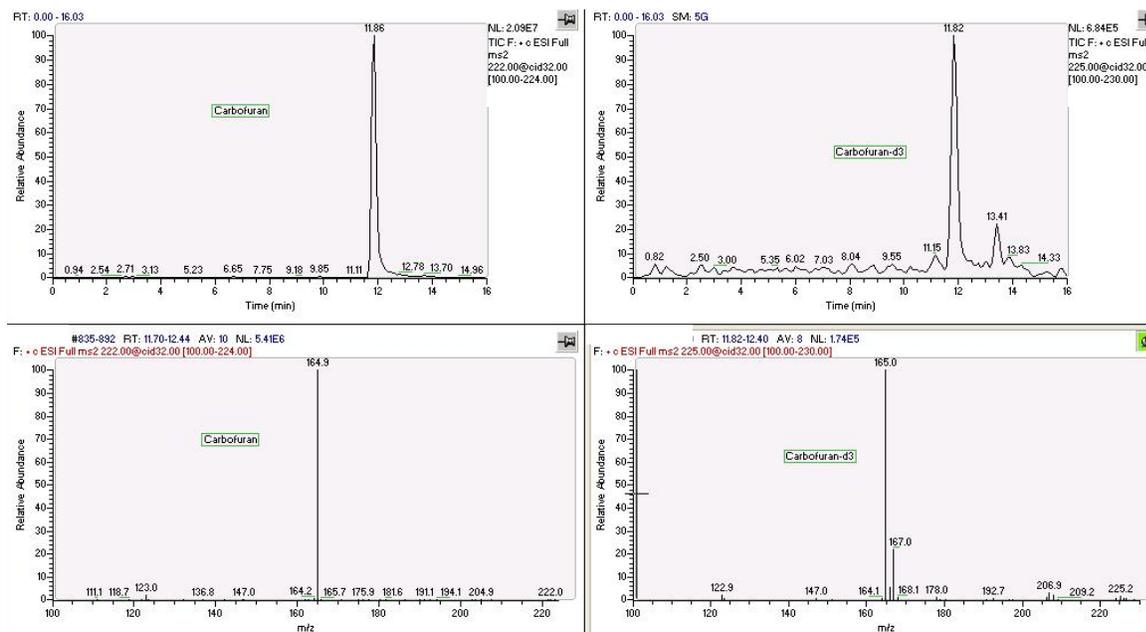
- Si bien la concentración de plaguicida encontrada en sangre es diferente para cada uno de los casos dentro del rango dinámico de análisis, los hallazgos post-mortem externos e internos descritos no presentan diferenciación por una concentración baja o alta.
- Como se había comentado en el marco conceptual, aunque la necropsia por intoxicación por plaguicidas se considera no específica puesto que las características patológicas no son únicas de estos compuestos, si ofrece información que orienta al patólogo, médico forense y al químico toxicólogo al abordaje del caso y al desarrollo de los análisis en las muestras colectadas, que efectivamente disminuye los tiempos de respuesta, desgaste en otros análisis toxicológicos y costos del Laboratorio.

Como ejemplo, en las figuras 4-46, 4-47 y 4-48 se encuentran los cromatogramas y espectros de masas de los plaguicidas hallados de tres casos distintos.

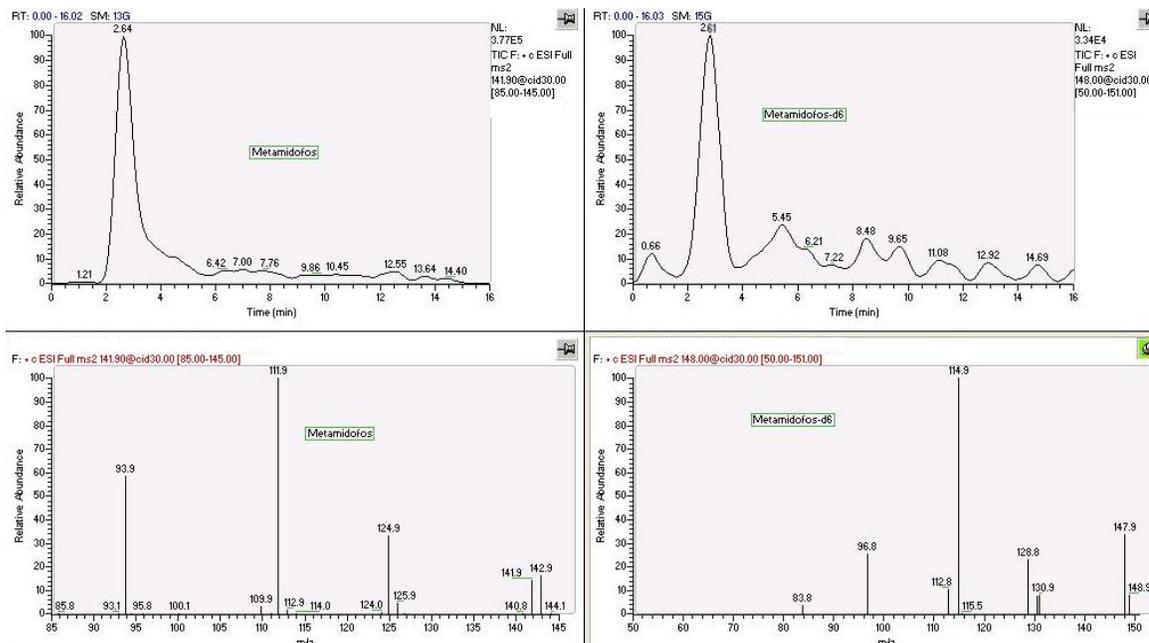
**Figura 4-46:** Cromatograma y espectro de masas del Aldicarb y su estándar interno Aldicarb-d<sub>3</sub> obtenido para el caso No 6.



**Figura 4-47:** Cromatograma y espectro de masas del carbofuran y su estándar interno carbofuran-d<sub>3</sub> obtenido para el caso No 13.



**Figura 4-48:** Cromatograma y espectro de masas del metamidofos y su estándar interno metamidofos-d<sub>6</sub> obtenido para el caso No 33.



### ▪ Distribución porcentual de muertes según el plaguicida asociado y su concentración encontrada en sangre

La concentración de plaguicida en sangre encontrada para los casos analizados registra que el carbofuran es letal no sólo es el rango de cuantificación, sino que también menor del LLOQ y mayor del LOD; así como a concentraciones superiores al ULOQ de 5,0 µg/mL. No se encontraron casos entre las concentraciones de 0,25 a 0,50 µg/mL (Figura 4-49). Aunque en el presente estudio, no se tiene certeza del tiempo transcurrido desde la ingesta de cada plaguicida hasta el momento de la toma de muestra en la necropsia, las concentraciones obtenidas en sangre en este caso para el carbofuran son consistentes con las concentraciones encontradas en casos de intoxicación aguda de hombres y mujeres entre nueve y varias horas post-ingestión (0,3 – 12 µg/mL), otras concentraciones reportadas en la literatura en sangre llegan hasta 43 µg/mL como se puso de manifiesto en el marco conceptual (Baselt, 2004).

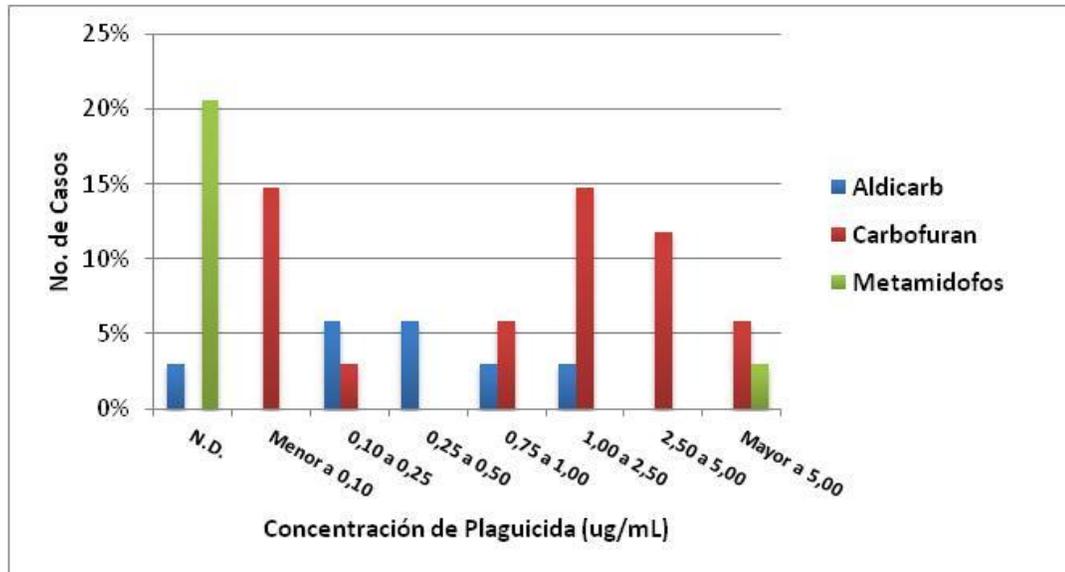
La concentración de aldicarb en sangre fue encontrado entre 0,10 y 2,5 µg/mL (18%) y en un caso (3%) no se detectó el aldicarb cuando el análisis del contenido gástrico previo arrojó un resultado positivo. Este caso específico podría abordarse desde varios puntos

de vista toxicológico, inicialmente la adolescente en forma voluntaria ingiere un plaguicida comercial con el principio activo aldicarb y posteriormente llamó a su madre para despedirse, quien inmediatamente le suministra una bebida casera para inducir el vómito y luego fue llevada al hospital donde comienzan las maniobras de desintoxicación entre las que se incluyen intubación y lavado gástrico con carbón activado. Estos procedimientos llevados a cabo para intentar salvar la vida de la joven consiguieron disminuir la concentración del aldicarb en sangre o evitar su total distribución (Figura 4-49). Casos registrados en la literatura reportaron niveles en sangre de aldicarb entre 0,10 – 3,2 µg/mL después de 3 – 13 horas de ingestión y en dos casos de sangre postmortem con 4,8 y 11 µg/mL. Según estos resultados, las concentraciones en sangre obtenidas de las muestras del presente estudio son menores a las reportadas en la literatura de sangre de occisos, sin embargo, es evidente que la concentración de aldicarb alcanzada en sangre para los casos analizados fue suficiente para causar la muerte (Baselt, 2004).

En cuanto al metamidofos aunque fue encontrado en todos los casos en contenido gástrico, en sangre sólo se detectó un 3% (un caso) a una concentración mayor al ULOQ. De la misma forma que el aldicarb se podría explicar de acuerdo a las medidas tomadas con el intoxicado tanto en el lugar de los hechos como de tratamiento médico, sin embargo; se destaca que los casos que asocia este plaguicida no hay registro de esta información.

Otro aspecto que explica la no detección de metamidofos en sangre cuando previamente se había detectado en el contenido gástrico, está asociado a su estabilidad como se mencionó en el proceso de validación. Es decir, si la concentración inicial del metamidofos se encontraba en el rango de concentración estudiado y cuando la sangre fue analizada ya había transcurrido más de una semana probablemente no se detecte debido a su descomposición. Respecto al caso donde se encontró a una concentración mayor a 5,0 µg/mL, indica que el metamidofos podría ser estable en sangre después de una semana siempre y cuando esté presente a altas concentraciones de tal forma que a pesar de su velocidad de descomposición aun se pueda detectar su remanente en esta matriz (Figura 4-49). Este resultado es consistente con los reportes en la literatura de concentraciones de metamidofos en sangre de occisos dados entre 6,2 - 161 µg/mL (Baselt, 2004).

**Figura 4-49:** Relación de muertes asociadas al plaguicida y su concentración encontrada en sangre.



#### ▪ Análisis de orina de los casos asociados a metamidofos

Con el propósito de contextualizar el análisis toxicológico forense de los casos asociados con el metamidofos, se analizó la orina de los cuales se contaba con esta muestra bajo el procedimiento de extracción utilizado en el laboratorio para el análisis de medicamentos en esta matriz. Los resultados se encuentran en la siguiente tabla 4-31.

**Tabla 4-31:** Comparación de los resultados obtenidos en la matriz sangre y orina de los casos asociados a metamidofos.

| Caso No | Concentración en sangre µg/mL | Resultado en orina |
|---------|-------------------------------|--------------------|
| 27      | ND                            | Metamidofos        |
| 28      | ND                            | No hay orina       |
| 29      | ND                            | ND                 |
| 30      | ND                            | No hay orina       |
| 31      | ND                            | Metamidofos        |
| 32      | ND                            | ND                 |
| 33      | mayor a 5,0                   | Metamidofos        |
| 34      | ND                            | No hay orina       |

ND No detectado  
LOD en orina: 0,020 µg/mL

De los ocho casos asociados con el plaguicida metamidofos, cinco de ellos contaban con la matriz orina para su análisis. Se detectó metamidofos en tres de ellos, especialmente en dos casos donde no se había detectado el plaguicida en sangre. Estos resultados, confirman la importancia de considerar otras matrices biológicas cuando se sospecha de intoxicación con metamidofos en respuesta a la no estabilidad en el tiempo de este analito en sangre en las concentraciones analizadas. Este análisis se logró puesto que el metamidofos se encuentra en la orina sin biotransformar totalmente a su metabolito (O,S-DMPT).

### ▪ **Análisis estadístico de correspondencias múltiples de los casos analizados**

Con el interés de realizar un análisis más contextualizado que integre las características mencionadas de edad, género, lugar de procedencia y manera de muerte con las concentraciones de aldicarb, carbofuran y metamidofos de los 34 casos forenses, se realizó un análisis de correspondencias múltiples.

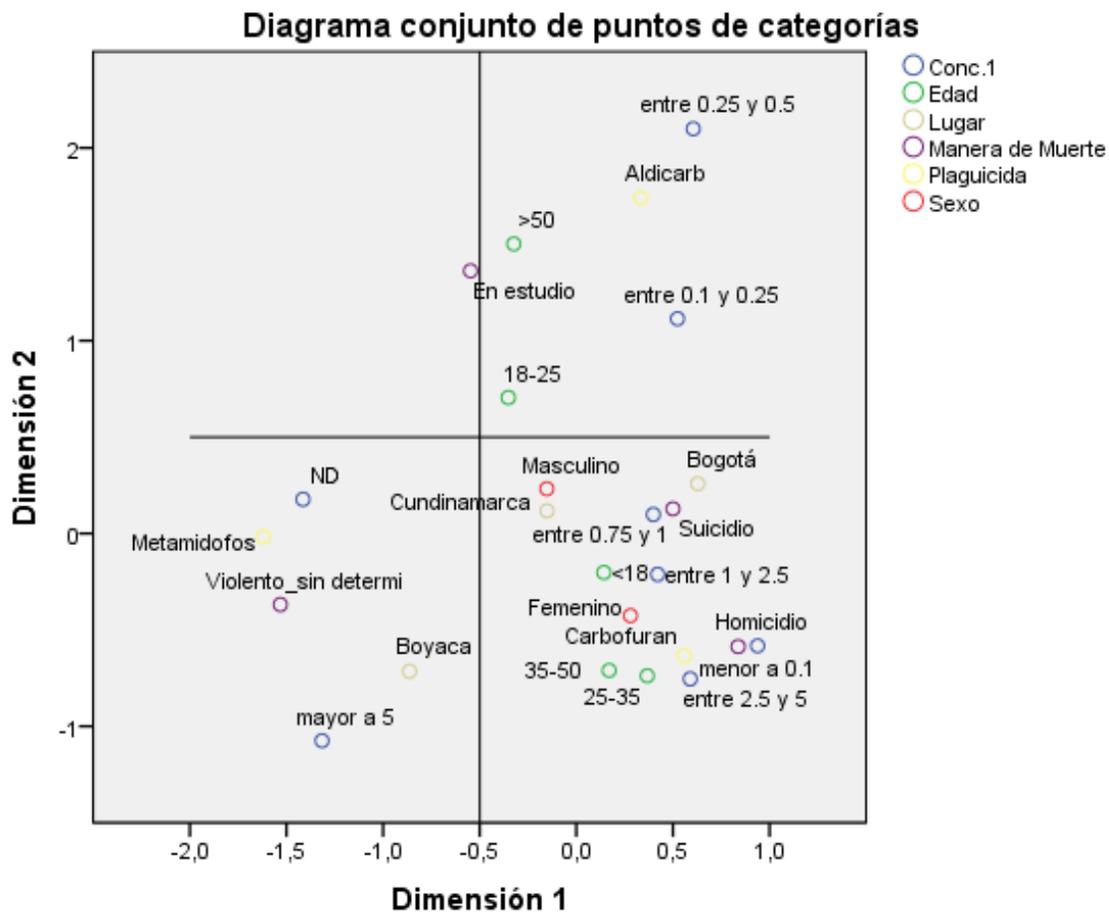
El análisis de correspondencias múltiples, es una técnica que estudia las relaciones entre las categorías de  $Q$  variables cualitativas a partir de una muestra de  $n$  individuos, si existe alguna variable cuantitativa, ésta se puede transformar en cualitativa, dividiendo su rango en intervalos, cada intervalo será una categoría de la nueva variable cualitativa.

La variable edad fue categorizada en intervalos correspondidos de: menor a 18, de 18 a 25, 25 a 35, 35 a 50 y mayor a 50. Este análisis generalmente se realiza en dos dimensiones para efectos de interpretación se van a tener en cuenta la dimensión 1 y la dimensión 2 principalmente, y como auxiliar la dimensión 3 que nos da cierto aporte para lograr dar una visión de cada uno de los plaguicidas. A continuación se muestra el resumen del modelo teniendo en cuenta las tres dimensiones consideradas. De donde es posible observar que la dimensión 1 recoge el 56,6% de la varianza mientras que las dimensiones dos y tres el 46,9% y el 37,1% de la varianza respectivamente (Tabla 4-32).

**Tabla 4-32:** Resumen del modelo para el análisis de correspondencias múltiples de los casos forenses analizados.

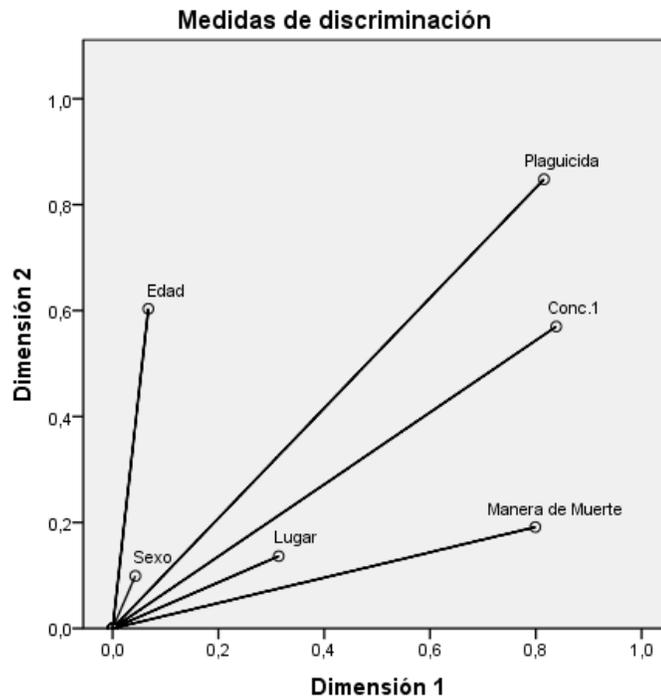
| Dimensión | Alfa de Cronbach  | Varianza explicada  |         |                  |
|-----------|-------------------|---------------------|---------|------------------|
|           |                   | Total (Autovalores) | Inercia | % de la varianza |
| 1         | ,809              | 2,834               | ,567    | 56,688           |
| 2         | ,718              | 2,349               | ,470    | 46,976           |
| 3         | ,577              | 1,856               | ,371    | 37,124           |
| Total     |                   | 7,039               | 1,408   |                  |
| Media     | ,717 <sup>a</sup> | 2,346               | ,469    | 46,929           |

En seguida se muestran los gráficos de asociaciones para la dimensión uno y dos, donde se pueden ver asociaciones (indicadas por la cercanía en el gráfico de las variables), tales como que el plaguicida carbofuran está más asociado a la manera de muerte suicidio y homicidio, mientras que el plaguicida metamidofos está más relacionada a la muerte violenta indeterminada. También se observa que el suicidio afecta tanto a las mujeres como a los hombres (Figura 4-50).

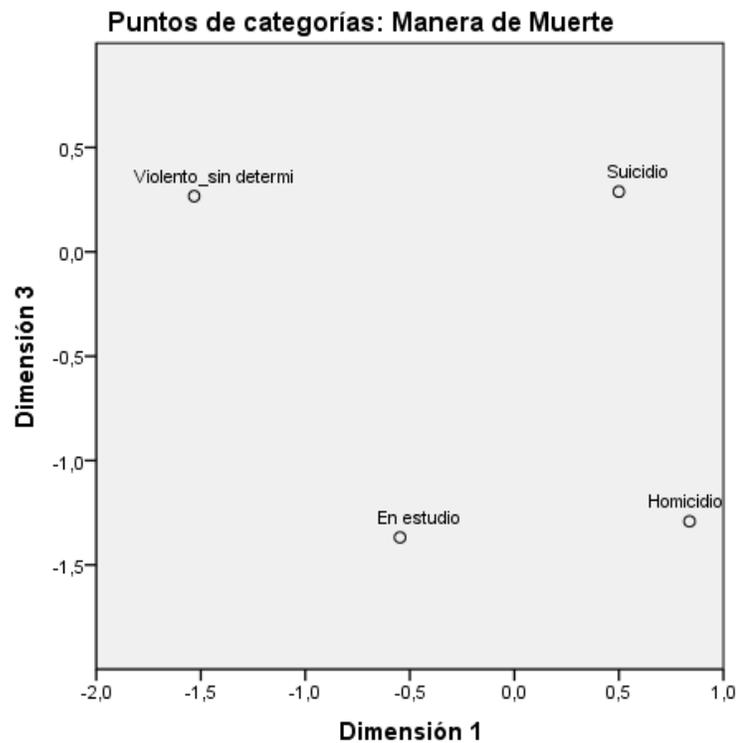
**Figura 4-50:** Análisis de correspondencias de acuerdo a las categorías.

Las contribuciones absolutas ayudan a dar una interpretación a los ejes principales. En primer lugar, se buscan las variables que más contribuyen a la construcción de los ejes. Por medio de la gráfica de medidas de discriminación se observa que la variable que más aporta al eje x es la manera de muerte, este eje clasifica en la parte negativa las muertes violentas sin determinar y aun en estudio, y en la parte positiva las muertes por homicidio y suicidio. Es de anotar que este eje separa la manera de muerte por las verificadas de las que aun no se tiene certeza. Por otro lado, las variables que más aportan en la construcción del eje y son edad y género de la persona, esto se puede observar en la figuras 4-51 y 4-52.

**Figura 4-51:** Contribuciones absolutas al análisis de correspondencias de acuerdo a la categoría.



**Figura 4-52:** Contribuciones absolutas al análisis de correspondencias de acuerdo a la manera de muerte.



## 5. Conclusiones y Recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

Se ha desarrollado una metodología analítica mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para la determinación simultánea de los plaguicidas aldicarb, carbofuran y metamidofos en sangre. La utilización de LC-MS/MS ha demostrado una gran utilidad en la determinación de los plaguicidas en estudio, ya que en muchos casos los bajos niveles de plaguicidas presentes en esta matriz requieren de técnicas que suministren una elevada sensibilidad.

El método fue validado a satisfacción de acuerdo a los parámetros establecidos para metodologías bioanalíticas en guías de organismos de reconocimiento internacional y artículos de toxicología. Los parámetros estudiados fueron la selectividad, linealidad (rango de 0,10 – 5,0 µg/mL), la precisión evaluada con repetibilidad y precisión intermedia (CV < 15%), exactitud (MRE < 15%), límite de detección (20 - 50 ng/mL), límite de cuantificación (0,10 µg/mL), límite superior de cuantificación (5,0 µg/mL), recuperación (90-102%), la intensidad relativa de iones (CV < 20%), efecto matriz (menor al  $\pm 25$  y CV < 15%), efecto memoria y la estabilidad a temperatura ambiente y en el automuestreador para los tres plaguicidas (entre 80 y el 120%). El aldicarb y carbofuran son estables (entre 80 y el 120%) a largo plazo en sangre bajo refrigeración, el metamidofos no presentó estabilidad durante este periodo de tiempo.

La metodología analítica descrita se aplicó a los análisis de muestras de sangre de 34 casos forenses remitidos al laboratorio de Toxicología del Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la Regional Bogotá para la interpretación de la causa de muerte, provenientes de Cundinamarca, Boyacá y Bogotá durante el último trimestre del 2012. El carbofuran fue encontrado en un amplio rango de concentración desde por encima del

LOD de 0,020 µg/mL hasta mayor a 5,0 µg/mL, el aldicarb se encontró desde 0,10 hasta 2,5 µg/mL y el metamidofos a una concentración mayor de 5,0 µg/mL.

De los casos del presente estudio un 53% fueron provenientes de Cundinamarca, el 29% de Boyacá y el 18% de Bogotá. El carbofuran fue el carbamato más encontrado con un 56% de los casos, predominando las intoxicaciones letales en Cundinamarca y Boyacá, seguido por el metamidofos con un 23% entre estos dos departamentos y el aldicarb con un 21% predomina en las intoxicaciones letales en Bogotá y en tercer lugar en Cundinamarca. El departamento de Boyacá no presentó intoxicación por aldicarb, resultado que pone al descubierto la presencia de este plaguicida como matarratas de forma informal en Cundinamarca y Bogotá sin restricción legal en su venta.

De las 34 muestras estudiadas, el género masculino presentó mayor número de intoxicaciones letales (65%) con los plaguicidas aldicarb, carbofuran y metamidofos con respecto al femenino (35%). El grupo etario entre los 36 y 50 años en ambos géneros y en mujeres los menores a 18 años son los más vulnerables a perder la vida por esta causa. La manera de muerte asociada a los plaguicidas en estudio con mayor proporción fue el suicidio (62%) seguido por la violenta sin determinar (23%). Estos datos son preocupantes a nivel social, si bien la comunidad científica y las autoridades sanitarias están tomando conciencia de la influencia de los plaguicidas y la importancia en la sensibilización de las distintas comunidades en la protección y buenas prácticas agrícolas para minimizar intoxicaciones accidentales, el uso de estos productos para la terminación autoinfligida de la vida hacen una importante contribución a los patrones de suicidio en Cundinamarca, Boyacá y Bogotá que debe contemplarse en la intervención integral de prevención psicosocial de los planes de salud pública.

Los hallazgos de necropsia del intoxicado por los plaguicidas en estudio presentan en forma general hipoxia, mucosa gástrica hemorrágica, edema cerebral, edema pulmonar, petequias pleurales, fluidez sanguínea y aumento de los pesos de los órganos por congestión visceral generalizada. Signos que aunque importantes en la intoxicación por plaguicidas no son específicos de estos compuestos, por lo que definitivamente el análisis toxicológico de los plaguicidas aldicarb, carbofuran y metamidofos en la muestra de sangre proporciona valiosa información a la conclusión de la causa de muerte.

Los resultados obtenidos de aldicarb, carbofuran y metamidofos en sangre contribuyeron a dar respuesta científica desde el apoyo analítico y toxicológico forense a la administración de justicia y el nuevo método representa un análisis complementario sensible y confiable al existente, para el desarrollo de casos futuros de intoxicaciones fatales con estos plaguicidas que responde a la casuística del laboratorio de toxicología.

## 5.2 Recomendaciones

El estudio que se presenta en este trabajo constituye el primer acercamiento del análisis de plaguicidas empleando LC-MS/MS en el campo de la toxicología forense del país y abre las puertas para realizar otras investigaciones como:

En primer lugar, realizar el estudio de estabilidad de los plaguicidas aldicarb y carbofuran a un tiempo más prolongado que un mes. Y evaluar la estabilidad del metamidofos en otras condiciones de almacenamiento como la propuesta a -20 °C.

Adaptar el método descrito a otras matrices biológicas como la orina, ya que no siempre se cuenta con la matriz de sangre para el análisis toxicológico forense. Además la orina es la muestra de selección para determinar los metabolitos de biotransformación y al ampliar el análisis a esta matriz permite explicar en forma contextualizada el perfil metabólico del plaguicida.

Finalmente, aumentar el número de plaguicidas de análisis en la sangre utilizando LC-MS/MS de acuerdo a los compuestos de este tipo más empleados en nuestro país y extenderlo a otros departamentos, con el fin de realizar el perfil del occiso intoxicado por plaguicidas en Colombia.

## Bibliografía

- A, D. G. F., Mancipe, L. C., & Diana, G. (2010). Intoxicación por Organofosforados. *Revista Med*, 18(49), 84–92.
- Abdollahi, M., & Karami-Mohajeri, S. (2012). A comprehensive review on experimental and clinical findings in intermediate syndrome caused by organophosphate poisoning. *Toxicology and applied pharmacology*, 258(3), 309–14.
- Ackley, K. L., & Joseph A. Caruso. (2003). Separation Techniques: Liquid Chromatography (pp. 147–162).
- Adachi, N., Kinoshita, H., Nishiguchi, M., Takahashi, M., Ouchi, H., Minami, T., Matsui, K., et al. (2008). Simultaneous analysis of acephate and methamidophos in human serum by improved extraction and GC-MS. *Forensic Toxicology*, 26(2), 76–79.
- Ageda, S., Fuke, C., Ihama, Y., & Miyazaki, T. (2006). The stability of organophosphorus insecticides in fresh blood. *Legal medicine (Tokyo, Japan)*, 8(3), 144–9.
- Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos EPA. (2012). <http://www.epa.gov/opp00001/methods/ram12b.htm>. *Index of Residue Analytical Methods. Consultada Febrero 2013*
- Ahmed, F. E. (2001). Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. *Science*, 20(11), 649–661.
- Alder, L., & Greulich, K. (2006). Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS? *Mass Spectrometry Reviews*, 838–865.
- Almeida, a M., Castel-Branco, M. M., & Falcão, a C. (2002). Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 774(2), 215–22.
- Ameno, K., Lee, S. K., In, S. W., Yang, J. Y., Yoo, Y. C., Ameno, S., Kubota, T., et al. (2001). Blood carbofuran concentrations in suicidal ingestion cases. *Forensic science international*, 116(1), 59–61.

- Ardrey, R. E. (2003). *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction* (Vol. 1, pp. 1–233).
- Asri Kamarruddin, A. R. A. (2000). Optimisation of solid phase microextraction (SPME) conditions for headspace analysis of organophosphate pesticides in whole blood. *Problems of Forensic Sciences*, 42, 47–58.
- Barguil Díaz, I. C., Lozano Mosquera, N., & Pinto Hernández, Julieth Katerine Aristizábal Maquilón, J. J. (2012). Síndrome intermedio en intoxicación aguda por organofosforados : reporte de caso. *MEDICINA U.P.B.*, 31(1), 53–58.
- Baselt, R. C. (2004). *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man* (Seventh Ed., pp. 28–29, 172–173, 682–683.).
- Bell, S. (2013). *Forensic Chemistry*. (Second Edi., p. Capítulo 10).
- Blume, H., Brendel, E., Brudny-Klöppel, M., Grebe, S., Lausecker, B., Rohde, G., & Siethoff, C. (2011). Workshop/conference report on EMA draft guideline on validation of bioanalytical methods. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 42(3), 300–5.
- Boelsterli, U. A. (2003). *Mechanistic Toxicology. The molecular basis of how chemicals disrupt biological targets* (p. Cap 12).
- Brea, S. G. (2009). *Nuevas aportaciones de LC-MS con analizadores de triple cuadrupolo y tiempo de vuelo en el análisis de residuos de plaguicidas y metabolitos en alimentos de origen vegetal*. Universitat Jaume I de Castellón.
- Brown, P., Charlton, a, Cuthbert, M., Barnett, L., Ross, L., Green, M., Gillies, L., et al. (1996). Identification of pesticide poisoning in wildlife. *Journal of chromatography. A*, 754(1-2), 463–78. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8997738>
- Byard, R. W., & Butzbach, D. M. (2012). Issues in the interpretation of postmortem toxicology. *Forensic science, medicine, and pathology*, 8(3), 205–7.
- Cappiello., A. (2007). Advances in LC–MS Instrumentation. *Journal of Chromatography Library*,, 72, 1–275.
- Cárdenas, O., Silva, E., Morales, L., & Ortiz, J. (2005). Estudio epidemiológico de exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos en siete departamentos colombianos , 1998-2001. *Biomédica*, 25, 10–80.
- Carmona-fonseca, J. (2003). Valores de referencia de la actividad de la colinesterasa eritrocitaria según las técnicas de Michel y EQM ® en población laboral de Antioquia , Colombia. *American Journal of Public Health*, 14(5), 316–324.

- Castro, H., & Mora, M. (2006). Validación Metodología para análisis de plaguicidas por Gases-Masas en muestras forenses. *Rev. Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses*, 19(3), 24–33.
- Castro, H., & Rodríguez, T. (2005). La Espectrometría de masas de plaguicidas en muestras de interés forense.
- Cazorla-Reyes, R., Fernández-Moreno, J. L., Romero-González, R., Frenich, A. G., & Vidal, J. L. M. (2011). Single solid phase extraction method for the simultaneous analysis of polar and non-polar pesticides in urine samples by gas chromatography and ultra high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*, 85(1), 183–96.
- Cervera, M. I., Portolés, T., Pitarch, E., Beltrán, J., & Hernández, F. (2012). Application of gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for target and non-target analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of chromatography. A*, 1244, 168–77.
- Cornell University, Michigan State University, Oregon State University, and U. of C. (n.d.). EXTOWNET Extension Toxicology Network. <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extownet/haloxyp-methylparathion/methamidophos-ext.html#14>. Consultada Enero 2013
- Dawson, A. H., Eddleston, M., Senarathna, L., Mohamed, F., Gawarammana, I., Bowe, S. J., Manuweera, G., et al. (2010). Acute human lethal toxicity of agricultural pesticides: a prospective cohort study. *PLoS medicine*, 7(10).
- De Bleecker, J. L. (2008). Organophosphate and carbamate poisoning. *Handbook of clinical neurology* (Vol. 91, pp. 401–32).
- DiMaio, V. J., & DiMaio, D. (2001). *Forensic Pathology. Second Edition* (p. Cap 1, 23).
- Dolinak, D., Matshes, E. W., & Lew, E. O. (2005). *Forensic Pathology Principles and Practice* (pp. Cap 2, 3, 21.).
- Drummer, O. H. (2007). Requirements for bioanalytical procedures in postmortem toxicology. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 388(7), 1495–503.
- Dulaurent, S., Moesch, C., Marquet, P., Gaulier, J.-M., & Lachâtre, G. (2010). Screening of pesticides in blood with liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(6), 2235–49.
- Ekman, R., Silberring, J., Westman-Brinkmalm, A., & Kraj, A. (2009). *Mass Spectrometry Instrumentation, Interpretation, and Applications* (p. Part I, III.).

- EMEA/CHMP/EWP. (2011). Guideline on bioanalytical method validation. *European Medicines Agency*, (July 2011).
- EPA, U. S. E. P. A. (2006). US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs Reregistration Eligibility Decision for Methamidophos, (July), 1–139.
- EPA, U. S. E. P. A. (2007). Reregistration Eligibility Decision for Aldicarb, (September), 1–18.
- FDA. (2001). Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration.
- Flórez, J. (1997). *Farmacología humana. 3 Edición* (p. 214).
- Fragar LG, Sankaran B, T. P. (2005). Health Outcomes in Australia – The facts –. *Rural Industries Research and development corporation and Australian centre for agricultural health and safety*, (6), 1–16.
- Gallardo, E., Barroso, M., & Queiroz, J. a. (2009). LC-MS: a powerful tool in workplace drug testing. *Drug testing and analysis*, 1(3), 109–15.
- Gama, M. R., Da Costa Silva, R. G., Collins, C. H., & Bottoli, C. B. G. (2012). Hydrophilic interaction chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 37, 48–60.
- García de Llasera, M. P., & Reyes-Reyes, M. L. (2009). A validated matrix solid-phase dispersion method for the extraction of organophosphorus pesticides from bovine samples. *Food Chemistry*, 114(4), 1510–1516. doi:10.1016/j.foodchem.2008.11.006
- García, R., & Repetto, M. (2008). Toxicología de Plaguicidas. *Curso de Experto en Toxicología*, Modulo 7, 22. 1–127.
- García-Rodríguez, D., Cela-Torrijos, R., Lorenzo-Ferreira, R. a., & Carro-Díaz, A. M. (2012). Analysis of pesticide residues in seaweeds using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass spectrometry detection. *Food Chemistry*, 135(1), 259–267.
- González Vides, G. (2011). *Intoxicación por plaguicidas: Casuística del hospital Universitario del Caribe y la clínica Universitario San Juan de Dios de Cartagena 2009 – 2010*.
- Greene, S. A., & Pohanish, R. P. (2005). *Sittig ' s Handbook of Pesticides and Agricultural Chemicals* (pp. 19–21,157–159, 559–560.).
- Gross, J. H. (2011). *Mass Spectrometry* (Second Edi., pp. Cap 1, 4, 9,12.).
- Guillarme, D., Nguyen, D. T.-T., Rudaz, S., & Veuthey, J.-L. (2007). Recent developments in liquid chromatography--impact on qualitative and quantitative performance. *Journal of chromatography. A*, 1149(1), 20–9.

- Gunnell, D., & Eddleston, M. (2003). Suicide by intentional ingestion of pesticides : a continuing tragedy in developing countries. *Int J Epidemiol*, 32(0117), 902–909.
- Gunnell, D., Eddleston, M., Phillips, M. R., & Konradsen, F. (2007). The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. *BMC public health*, 7(c), 357.
- Gupta, R. C. (2006). *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds* (p. Cap 10).
- Gutiérrez, M. (2008). *Guías para el manejo de Urgencias Toxicológicas*. Bogotá. Ministerio de la Protección Social.
- Hernández, F., Sancho, J. V., Ibáñez, M., & Grimalt, S. (2008). Investigation of pesticide metabolites in food and water by LC-TOF-MS. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(10), 862–872.
- Hernández, F., Sancho, J. V., & Pozo, O. J. (2005). Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 382(4), 934–46.
- Hocart, C. H. (2010). Mass Spectrometry : An Essential Tool for Trace Identification and Quantification (pp. 328–384).
- Hoffmann, E. de, & Stroobant, V. (2007). *Mass Spectrometry Principles and Applications* (Third Edit., pp. Cap 1,2, 4, 5.).
- Hurtado C., G. M. (2005). Organofosforados: Fundamentos prácticos en la Intoxicación aguda. *Rev. Fac. Med. Unal*, 53(4).
- ICA Instituto Colombiano Agropecuario. (2011). *Estadísticas de comercialización de plaguicidas químicos de uso agrícola 2010*. (pp. 1–95).
- ICH. (2005). International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1) (Vol. 1994).
- Idrovo, A. J. (2000). Vigilancia de las Intoxicaciones con Plaguicidas en Colombia. *Rev. Salud Pública.*, 2(1), 36–46.
- Iii, F. P. M., & Barnard, J. J. (2011). *Essentials of Anatomic Pathology*. (L. Cheng & D. G. Bostwick, Eds.) (p. Cap VI). New York, NY: Springer New York.
- INCHEM, C. S. I. from I. O. (n.d.).  
<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v92pr03.htm>. Visitada Marzo 2013.
- Inoue, S., Saito, T., Mase, H., Suzuki, Y., Takazawa, K., Yamamoto, I., & Inokuchi, S. (2007). Rapid simultaneous determination for organophosphorus pesticides in

- human serum by LC-MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 44(1), 258–64.
- INS Instituto Nacional de salud, subdirección de vigilancia y control en salud pública. (2012). *Intoxicación por Plaguicidas casos semanales y acumulado. Sistema de Vigilancia en Salud Pública SIVIGILA* (p. 1).
- Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. (2004). *Guía de procedimientos para la realización de necropsias medicolegales. Segunda edición.* (pp. 1–114).
- Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. (2011). Bases de Datos LIMS Grupo de Toxicología Bogotá.
- Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. (2012). Forensis 2011 Datos para la vida., 13(1), 245–265,311–352.
- Klaassen, C. D. (2008). *Casarett and Doull's Toxicology the basic science of poisons. Seventh Edition* (Seventh Ed., p. Cap 11, 22).
- Kmellár, B, Fodor, P., Pareja, L., Ferrer, C., Martínez-Uroz, M. a, Valverde, A., & Fernandez-Alba, a R. (2008). Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, 1215(1-2), 37–50.
- Kmellár, Béla, Pareja, L., Ferrer, C., Fodor, P., & Fernández-Alba, A. R. (2011). Study of the effects of operational parameters on multiresidue pesticide analysis by LC-MS/MS. *Talanta*, 84(2), 262–73.
- Krieger, R. (2001). *Handbook of Pesticide Toxicology. Principles* (Second Edi., p. Cap 44,45,46,48,49,51,52,53).
- Krieger, R. (2010). *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (Third Edit., p. Cap 12, 28,73,75).
- Kudo, K., Nagamatsu, K., Umehara, T., Usumoto, Y., Sameshima, N., Tsuji, A., & Ikeda, N. (2012). Rapid and reliable screening method for detection of 70 pesticides in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry using a constructed calibration-locking database. *Legal medicine (Tokyo, Japan)*, 14(2), 93–100.
- Kwon, H., Lehotay, S. J., & Geis-Asteggiate, L. (2012). Variability of matrix effects in liquid and gas chromatography-mass spectrometry analysis of pesticide residues after QuEChERS sample preparation of different food crops. *Journal of chromatography. A*, 1270, 235–45.

- Lacassie, E., Dreyfuss, M. F., Gaulier, J. M., Marquet, P., Daguet, J. L., & Lachâtre, G. (2001). Multiresidue determination method for organophosphorus pesticides in serum and whole blood by gas chromatography-mass-selective detection. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*, 759(1), 109–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11499614>
- Lacassie, E., Marquet, P., Gaulier, J. M., Dreyfuss, M. F., & Lachâtre, G. (2001). Sensitive and specific multiresidue methods for the determination of pesticides of various classes in clinical and forensic toxicology. *Forensic science international*, 121(1-2), 116–25.
- Lopez, C. (2013). <http://quimica.udea.edu.co/~carlopez/cromatohplc/hplc-ms.html#esi>. Consultada Febrero 2013.
- Manuweera, G., Eddleston, M., Egodage, S., & Buckley, N. a. (2008). Do targeted bans of insecticides to prevent deaths from self-poisoning result in reduced agricultural output? *Environmental health perspectives*, 116(4), 492–5.
- Marquet, P. (2002). Progress of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Therapeutic drug monitoring*, 24(2), 255–76.
- Mart, J., Vázquez, P. P., & Mart, J. L. (2000). Analysis of N-methylcarbamates insecticides and some of their main metabolites in urine with liquid chromatography using diode array detection and electrospray mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 412, 131–139.
- Martínez Vidal, J. L., Plaza-Bolaños, P., Romero-González, R., & Garrido Frenich, A. (2009). Determination of pesticide transformation products: a review of extraction and detection methods. *Journal of chromatography. A*, 1216(40), 6767–88.
- Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., & Chavez-Eng, C. M. (2003). Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical chemistry*, 75(13), 3019–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12964746>. Consultada Marzo 2013
- Maurer, H. H. (2007). Current role of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 388(7), 1315–25.
- McMaster, M. (2005). *LC/MS A practical User's Guide* (pp. 1–165).
- Moffat, A., & Osselson, D. (2011). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons: in pharmaceuticals, body fluids, and postmortem material* (pp. 258–287, 843, 1651.).
- Mora, M. (2007). Muertes relacionadas con intoxicación con plaguicidas. *Memorias III Encuentro Regional de Toxicología Forense TIAFT Colombia*.

- Moretto, A., & Lotyi, M. (2006). Peripheral Nervous System Effects and Delayed Neuropathy. *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds* (pp. 361–70).
- Mostafa, A., Medley, G., Roberts, D. M., Mohamed, M. S., Elshanawani, A. a, Roberts, M. S., & Liu, X. (2011). Simultaneous quantification of carbamate insecticides in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 879(23), 2234–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21723210>
- Niessen, W. M. A., & Group, F. (2006). *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry* (Third Edit., pp. 1–231).
- Nováková, L. (2012). Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography-mass spectrometry method with emphasis on fast analysis. *Journal of chromatography. A*.
- Olson, K. R. (2004). *Poisoning & Drug Overdose* (Fourth edi., p. Section II y IV).
- Organización Mundial de la Salud OMS. (1998). Sangre y componentes seguros.
- Organización Mundial de la Salud OMS. (2003a). Directrices sobre la gestión de los plaguicidas para la salud pública, 1–61.
- Organización Mundial de la Salud OMS. (2003b). *Hojas de información sobre sustancias químicas* (pp. 243–363).
- Ortiz, M. M., & Ochoa, M. E. (2010). *Perfil del occiso intoxicado por pesticidas y cianuro 2007- 2010 Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses Bucaramanga*.
- Parilla Vázquez, P., Martínez Vidal, J. L., & Martínez Fernández, J. (2000). Reversed-phase liquid chromatographic column switching for the determination of N-methylcarbamates and some of their main metabolites in urine. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*, 738(2), 387–94.
- Park, M.-J., In, S.-W., Lee, S.-K., Choi, W.-K., Park, Y.-S., & Chung, H.-S. (2009). Postmortem blood concentrations of organophosphorus pesticides. *Forensic science international*, 184(1-3), 28–31. doi:10.1016/j.forsciint.2008.11.008
- Peña, A., Perez, T., & Mahecha, M. (1990). *Intoxicación aguda con plaguicidas organofosforados* (pp. 1–130).
- Peters, F. T. (2011). Recent advances of liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Clinical biochemistry*, 44(1), 54–65.
- Peters, F. T., Drummer, O. H., & Musshoff, F. (2007). Validation of new methods. *Forensic science international*, 165(2-3), 216–24.

- Peters, F. T., & Maurer, H. H. (2002). Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review. *Accreditation and Quality Assurance*, 7(11), 441–449.
- Peters, F. T., & Remane, D. (2012). Aspects of matrix effects in applications of liquid chromatography-mass spectrometry to forensic and clinical toxicology--a review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 403(8), 2155–72.
- Petropoulou, S.-S. E., Gikas, E., Tsiropoulos, A., & Siskos, P. a. (2006). Gas chromatographic-tandem mass spectrometric method for the quantitation of carbofuran, carbaryl and their main metabolites in applicators' urine. *Journal of chromatography. A*, 1108(1), 99–110.
- Petrovic, M., Farré, M., De Alda, M. L., Perez, S., Postigo, C., Köck, M., Radjenovic, J., et al. (2010). Recent trends in the liquid chromatography-mass spectrometry analysis of organic contaminants in environmental samples. *Journal of chromatography. A*, 1217(25), 4004–17.
- Picó, Y., Blasco, C., & Font, G. (2004). Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: an overview. *Mass spectrometry reviews*, 23(1), 45–85.
- Proença, P., Teixeira, H., De Mendonça, M. C., Castanheira, F., Marques, E. P., Corte-Real, F., & Nuno Vieira, D. (2004). Aldicarb poisoning: one case report. *Forensic science international*, 146 Suppl, S79–81.
- Rambla-Alegre, M., Esteve-Romero, J., & Carda-Broch, S. (2012). Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. *Journal of chromatography. A*, 1232, 101–9. doi:10.1016/j.chroma.2011.10.050
- Repetto, M. (1995). *Toxicologia Avanzada* (pp. 557–601).
- Richards, N. (2012). *Carbofuran and Wildlife Poisoning: Global Perspectives and Forensic Approaches* (pp. 1–34).
- Risher, J. F., Mink, F. L., & Stara, J. F. (1987). The toxicologic effects of the carbamate insecticide aldicarb in mammals: a review. *Environmental health perspectives*, 72, 267–81.
- Roberts, D. M., Karunarathna, A., Buckley, N. a, Manuweera, G., Sheriff, M. H. R., & Eddleston, M. (2003). Influence of pesticide regulation on acute poisoning deaths in Sri Lanka. *Bulletin of the World Health Organization*, 81(11), 789–98.

- Rozet, E., Marini, R. D., Ziemons, E., Boulanger, B., & Hubert, P. (2011). Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 55(4), 848–58.
- Russi, R., & Rincón, H. (n.d.). *Toxicología y terapia de las intoxicaciones con plaguicidas* (pp. 1–137).
- Salihovic, S., Mattioli, L., Lindström, G., Lind, L., Lind, P. M., & Van Bavel, B. (2012). A rapid method for screening of the Stockholm Convention POPs in small amounts of human plasma using SPE and HRGC/HRMS. *Chemosphere*, 86(7), 747–53.
- Salm, P., Taylor, P. J., Roberts, D., & De Silva, J. (2009). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantitative determination of the organophosphorus pesticides dimethoate, fenthion, diazinon and chlorpyrifos in human blood. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 877(5-6), 568–74.
- SANCO/12495/2011. (2011). Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed.
- Secretaría del Convenio de Rotterdam. (2011). Documento de orientación para la adopción de decisiones Aldicarb.
- Shah, V. P., Midha, K. K., Findlay, J. W., Hill, H. M., Hulse, J. D., McGilveray, I. J., McKay, G., et al. (2000). Bioanalytical method validation--a revisit with a decade of progress. *Pharmaceutical research*, 17(12), 1551–7.
- Sinha, S. N., Vasudev, K., & Vishnu Vardhana Rao, M. (2011). Quantification of organophosphate insecticides and herbicides in vegetable samples using the “Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe” (QuEChERS) method and a high-performance liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry (LC–MS/MS) t. *Food Chemistry*. doi:10.1016/j.foodchem.2011.11.102
- Skopp, G. (2010). Postmortem toxicology. *Forensic science, medicine, and pathology*, 6(4), 314–25.
- SOFT / AAFS Forensic Laboratory Guidelines. (2006). Forensic Toxicology Laboratory Guidelines 2006 Version, 1–24.
- Soltaninejad, K., Faryadi, M., & Sardari, F. (2007). Acute pesticide poisoning related deaths in Tehran during the period 2003-2004. *Journal of forensic and legal medicine*, 14(6), 352–4.
- Stenersen, J. (2004). *Chemical pesticides mode of action and Toxicology* (p. Cap 5).
- Steven B. Karch, MD, F. (2007). *Postmortem Toxicology of Abused Drugs* (pp. 16–25).

- Tarbah, F. a, Mahler, H., Temme, O., & Daldrup, T. (2001). An analytical method for the rapid screening of organophosphate pesticides in human biological samples and foodstuffs. *Forensic science international*, 121(1-2), 126–33.
- Tennakoon, D. a S. S., Karunaratna, W. D. V, & Udugampala, U. S. S. (2012). Carbofuran concentrations in blood, bile and tissues in fatal cases of homicide and suicide. *Forensic science international*, 1–5.
- Thermo Electron Corporation. (2003). *Finnigan LCQ Series: Hardware Manual* (p. Cap 1,2,3, 4).
- ThermoFisher, S. (2011). LCQ Operations Course.
- Thundiyil, J. (2008). Acute pesticide poisoning: a proposed classification tool. *Bulletin of the World Health Organization*, 86(3), 205–209. doi:10.2471/BLT.08.041814
- Tomaszewska, E., & Hebert, V. R. (2003). Analysis of O,S-dimethyl hydrogen phosphorothioate in urine, a specific biomarker for methamidophos. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(21), 6103–9.
- Trufelli, H., Palma, P., Famigliani, G., Cappiello, A., Geologiche, S., Chimiche, T., Bo, C., et al. (2011). An overview of matrix effects in liquid chromatography - mass spectrometry, 491–509.
- Tsokos, M. (2005). *Forensic Pathology Reviews. Volume 2* (Vol. 2, p. Cap 11).
- Tsokos, M. (2006). *Forensic Pathology Reviews. Volume 4* (Vol. 4, p. Capt 10).
- United States Environmental Protection Agency EPA. (2007). US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs Reregistration Eligibility Decision for Carbofuran, 1–47.
- Vander Heyden, Y., Nijhuis, A., Smeyers-Verbeke, J., Vandeginste, B. G., & Massart, D. L. (2001). Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 24(5-6), 723–53.
- Wanner, K. T., & Hofner, G. (2007). *Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry* (p. Cap 1).
- Wesseling, C., Corriols, M., & Bravo, V. (2005, September 1). Acute pesticide poisoning and pesticide registration in Central America. *Toxicology and applied pharmacology*. Retrieved June 26, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16153991>
- WHO World Health Organization. (2010). The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009.

- Wilkowska, A., & Biziuk, M. (2011). Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry*, 125(3), 803–812. doi:10.1016/j.foodchem.2010.09.094
- Wood, M., Laloup, M., Samyn, N., Del Mar Ramirez Fernandez, M., De Bruijn, E. a, Maes, R. a a, & De Boeck, G. (2006). Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry in forensic science. *Journal of chromatography. A*, 1130(1), 3–15.
- Yinon, J. (2004). *Advances in Forensic Applications of Mass Spectrometry*. New York (pp. 63–128).

# A. Anexo: Aceptación de Residencia en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses



INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA LEGAL Y CIENCIAS FORENSES  
Escuela de Medicina Legal y Ciencias Forenses

EML-985-2012

Bogotá, 13 de Julio de 2012

Doctores  
JAIRO A. TÉLLEZ  
Coordinador Académico  
Programa Curricular Maestría en Toxicología  
NANCY PATIÑO  
Directora de Tesis del Departamento de Toxicología  
Universidad Nacional de Colombia  
Bogotá.-

REFERENCIA: Oficios No. MT-Fechado 27 de Junio 2012;-EML No-924;-DRB-1762-Julio12 2012.

Cordial saludo Doctores:

En atención a su solicitud de la referencia y de conformidad con el proceso cumplido por esta Coordinación, internamente ante la Dirección Regional Bogotá y la Coordinación del Grupo de Toxicología, nos permitimos informar que la rotación para la Residente de la Maestría en Toxicología ha sido aprobada, pero es importante comunicarle para su conocimiento y fines pertinente, que:

- ✓ Que para dar cumplimiento con los procesos, procedimientos y normas de bioseguridad internas de nuestra Institución, la Universidad debe enviar la carta de presentación Institucional de la residente.

Nota:

5. Agradecemos igualmente dejar conocer al Instituto el producto y resultados de la rotación.
6. El Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses No provee ni vende dotación a ningún rotante.

Atentamente,

  
V<sup>B</sup> CARMEN ESTHER ORJUELA HENAO  
Coordinadora (e) Escuela de Medicina Legal  
y Ciencias Forenses

  
CLARAIVETT CORTES CALLEJAS  
Profesional Escuela de Medicina Legal

Copia; Subdirección de Investigación Científica;-Coordinador Laboratorio Toxicología;-Residente -Archivo Escuela de Medicina Legal  
Anexo:  
Proyectó: Claraivett Cortes Callejas-Profesional Universitario Escuela de Medicina Legal  
Revisó: Carmen Esther Orjuela Henao

"Servicio Forense Efectivo"

CALLE 7 A N° 12 - 61 piso 2 [escuela@medicinalegal.gov.co](mailto:escuela@medicinalegal.gov.co)  
Teléfonos: 4069944 - 4069977- 6061106 Ext: 1239-1240-1246-1264-1265 Fax: 1244  
Bogotá - Colombia  
[www.medicinalegal.gov.co](http://www.medicinalegal.gov.co)

16° CONGRESO NACIONAL DE MEDICINA LEGAL Y CIENCIAS FORENSES

"Diversas ciencias, un solo conocimiento forense"

Bogotá, del 15 al 17 de agosto de 2012  
[www.congresoforensecolombia2012.com](http://www.congresoforensecolombia2012.com)

## B. Anexo: Aprobación cambio de Título



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
SEDE BOGOTÁ  
FACULTAD DE MEDICINA  
CONSEJO DE FACULTAD



**SA-0438**

Bogotá D.C., 17 de mayo de 2.012

Doctor  
**JAIRO ALFONSO TÉLLEZ MOSQUERA**  
Coordinador  
Maestría en Toxicología  
Facultad de Medicina  
Universidad Nacional de Colombia

Respetado doctor Téllez:

De manera atenta informo que el Consejo de Facultad en su sesión del día 26 de abril de 2.012, Acta 14, avaló el cambio de título y de director del proyecto de tesis, de la estudiante de la Maestría en Toxicología relacionada a continuación:

| ESTUDIANTE   | PROYECTO   | DIRECTOR  |
|--|--|---|
| DIANA JAZMIN<br>MARIÑO<br>Código 598909<br>CC 43207714 | "DETERMINACION DE LOS<br>PLAGUICIDAS<br>ALDICARB, CARBOFURANO,<br>DICLORVOS Y METAMIDOFOS<br>EN SANGRE PROVENIENTES<br>DE CASOS FORENSES<br>MEDIANTE CROMATOGRFIA<br>LIQUIDA CON<br>ESPECTROMETRIA DE MASAS<br>TÁNDEM LC-ESI-MS/MS EN<br>CUNDINAMARCA, BOYACA Y<br>BOGOTÁ" | NANCY PATIÑO REYES<br>Licenciada Química MSc en Gestión<br>Ambiental con Especialización en<br>Residuos de Plaguicidas Docente<br>Departamento de Toxicología<br><br>CODIRECTOR<br>MIGUEL ANGEL TORRES WILCHES<br>Químico Farmacéutico, MSc. en<br>Farmacia-área de toxicología y análisis<br>toxicológico, Doctorado en Fisiopatología<br>celular y Molecular e implicaciones<br>Farmacológicas. |

Cordial saludo,

**KARIM MARTINA ALVIS GÓMEZ**  
Secretaria de Facultad

: Oficina de Historias Académicas

**145 años**  
Innovando

Carrera 30 No. 45-03, FACULTAD DE MEDICINA, Edificio 471 Piso 2°, Oficina 216  
Teléfono: (57-1) 316 5618 Comutador: (57-1) 316 5000 Ext. 15140 Fax: 15150  
Correo electrónico: secreacad\_fm bog@unal.edu.co  
Bogotá, Colombia, Sur América

## C. Anexo: Aprobación del Comité de Ética



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA  
MAESTRÍA EN TOXICOLOGÍA

Bogotá D.C., 27 de agosto de 2012  
MT-330-12

Estudiante  
**DIANA JAZMIN MARIÑO**  
Maestría en Toxicología  
Facultad de Medicina

Apreciada Estudiante

Comedidamente me permito informarle que el Comité de Ética de la Facultad de Medicina en su reunión del día 31 de julio de 2012 acta No 98, dio su concepto aprobatorio del proyecto de tesis titulado, "DETERMINACION DE LOS PLAGUICIDAS ALDICARB, CARBOFURANO, DICLORVOS Y METAMIDOFOS EN SANGRE PROVENIENTES DE CASOS FORENSES MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA CON ESPECTROMETRIA DE MASAS TÁNDEM LC-ESI-MS/MS EN CUNDINAMARCA, BOYACA Y BOGOTÁ".

Agradezco su atención a la presente

Se anexa copia de la comunicación CE-013

Cordialmente

**JAIRO ALFONSO TELLEZ MOSQUERA**  
Profesor Titular  
Coordinador Académico  
Programa Curricular Maestría en Toxicología  
Departamento de Toxicología

Elizabeth

Copia: Nancy Patiño Reyes Directora de Tesis

145 años  
Innovando

Carrera 30 No. 45-03, FACULTAD DE MEDICINA piso 2ª Oficina 203  
Teléfono(s): 3165153 directo Conmutador: 3165000 extensión 15120, 15184, 15056  
Correo electrónico: maetoxico\_fm bog@unal.edu.co  
Bogotá Colombia, Sur América

## D. Anexo: Datos para cálculo de parámetros de validación

Cuadro 1: Datos para elaborar las curvas de calibración de sistema y método día 1.

| Concentración<br>(mg/mL) | Relación de Áreas         |                               |                                 |                           |                               |                                 |
|--------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
|                          | Sistema                   |                               |                                 | Método                    |                               |                                 |
|                          | Aldicarb /<br>Aldicarb-d3 | Carbofuran /<br>Carbofuran-d3 | Metamidofos /<br>Metamidofos-d6 | Aldicarb /<br>Aldicarb-d3 | Carbofuran /<br>Carbofuran-d3 | Metamidofos /<br>Metamidofos-d6 |
| <b>0,10</b>              | 0,267                     | 0,887                         | 0,334                           | 0,369                     | 1,099                         | 0,325                           |
|                          | 0,284                     | 0,953                         | 0,248                           | 0,324                     | 1,131                         | 0,365                           |
|                          | 0,378                     | 1,087                         | 0,280                           | 0,410                     | 1,095                         | 0,360                           |
|                          | 0,271                     | 1,067                         | 0,308                           | 0,328                     | 1,062                         | 0,418                           |
|                          | 0,362                     | 1,077                         | 0,268                           | 0,315                     | 1,136                         | 0,365                           |
| <b>0,25</b>              | 0,876                     | 2,885                         | 0,733                           | 0,941                     | 2,855                         | 0,830                           |
|                          | 1,029                     | 3,015                         | 0,705                           | 0,915                     | 2,632                         | 0,699                           |
|                          | 0,847                     | 2,805                         | 0,874                           | 0,940                     | 2,642                         | 0,792                           |
|                          | 0,926                     | 3,032                         | 0,699                           | 0,978                     | 2,662                         | 0,818                           |
|                          | 0,837                     | 2,792                         | 0,701                           | 1,025                     | 2,624                         | 0,797                           |
| <b>0,50</b>              | 1,908                     | 6,078                         | 1,608                           | 1,985                     | 5,746                         | 1,647                           |
|                          | 1,869                     | 5,959                         | 1,477                           | 1,927                     | 5,372                         | 1,488                           |
|                          | 2,007                     | 6,260                         | 1,443                           | 1,913                     | 5,330                         | 1,583                           |
|                          | 1,912                     | 5,832                         | 1,412                           | 1,675                     | 5,705                         | 1,533                           |
|                          | 2,045                     | 6,197                         | 1,433                           | 2,086                     | 5,333                         | 1,359                           |
| <b>0,75</b>              | 2,687                     | 9,078                         | 2,209                           | 2,972                     | 8,365                         | 2,273                           |
|                          | 2,955                     | 8,662                         | 2,140                           | 2,951                     | 8,025                         | 1,935                           |
|                          | 3,040                     | 9,822                         | 2,493                           | 2,825                     | 8,473                         | 2,213                           |
|                          | 3,311                     | 8,241                         | 2,090                           | 3,192                     | 8,371                         | 2,222                           |
|                          | 2,906                     | 8,285                         | 2,435                           | 2,871                     | 7,673                         | 2,274                           |
| <b>1,00</b>              | 4,110                     | 11,779                        | 2,784                           | 4,309                     | 10,837                        | 2,738                           |
|                          | 3,881                     | 11,683                        | 2,666                           | 4,249                     | 10,635                        | 2,627                           |
|                          | 3,904                     | 11,962                        | 2,892                           | 3,767                     | 9,439                         | 3,119                           |
|                          | 4,339                     | 11,591                        | 2,775                           | 3,956                     | 10,208                        | 2,970                           |
|                          | 3,741                     | 10,805                        | 2,709                           | 4,002                     | 11,484                        | 3,002                           |
| <b>2,50</b>              | 10,259                    | 29,835                        | 5,913                           | 9,848                     | 26,350                        | 7,010                           |
|                          | 11,297                    | 28,866                        | 7,302                           | 9,968                     | 26,129                        | 6,959                           |
|                          | 10,419                    | 29,485                        | 7,208                           | 9,979                     | 25,940                        | 7,049                           |
|                          | 10,519                    | 29,037                        | 7,209                           | 9,957                     | 26,236                        | 7,185                           |
|                          | 10,346                    | 28,446                        | 6,970                           | 10,003                    | 26,469                        | 6,823                           |
| <b>5,00</b>              | 20,969                    | 54,222                        | 14,349                          | 20,322                    | 52,233                        | 12,889                          |
|                          | 21,028                    | 55,535                        | 14,219                          | 20,058                    | 53,523                        | 13,775                          |
|                          | 21,207                    | 56,426                        | 14,058                          | 20,284                    | 51,210                        | 12,887                          |
|                          | 21,021                    | 56,116                        | 14,058                          | 20,419                    | 52,056                        | 12,620                          |
|                          | 20,689                    | 57,589                        | 14,473                          | 20,337                    | 53,876                        | 13,980                          |

**Cuadro 2:** Datos para elaborar las curvas de calibración de sistema y método día 2.

| Concentración<br>(mg/mL) | Relación de Áreas        |                               |                                 |                           |                               |                                 |
|--------------------------|--------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
|                          | Sistema                  |                               |                                 | Método                    |                               |                                 |
|                          | Aldicarb/<br>Aldicarb-d3 | Carbofuran /<br>Carbofuran-d3 | Metamidofos /<br>Metamidofos-d6 | Aldicarb /<br>Aldicarb-d3 | Carbofuran /<br>Carbofuran-d3 | Metamidofos /<br>Metamidofos-d6 |
| <b>0,10</b>              | 0,354                    | 1,030                         | 0,348                           | 0,312                     | 0,946                         | 0,348                           |
|                          | 0,332                    | 1,032                         | 0,374                           | 0,377                     | 1,012                         | 0,366                           |
|                          | 0,361                    | 1,026                         | 0,363                           | 0,348                     | 1,026                         | 0,384                           |
|                          | 0,364                    | 0,947                         | 0,363                           | 0,338                     | 1,028                         | 0,447                           |
|                          | 0,395                    | 1,038                         | 0,402                           | 0,370                     | 1,069                         | 0,376                           |
| <b>0,25</b>              | 1,133                    | 2,751                         | 0,853                           | 1,023                     | 2,467                         | 0,712                           |
|                          | 1,000                    | 2,585                         | 0,793                           | 1,080                     | 2,357                         | 0,688                           |
|                          | 1,174                    | 2,663                         | 0,774                           | 0,921                     | 2,447                         | 0,724                           |
|                          | 0,969                    | 2,516                         | 0,809                           | 1,005                     | 2,490                         | 0,676                           |
|                          | 0,951                    | 2,578                         | 0,766                           | 0,953                     | 2,447                         | 0,739                           |
| <b>0,50</b>              | 1,857                    | 5,416                         | 1,440                           | 1,992                     | 4,600                         | 1,356                           |
|                          | 1,932                    | 5,362                         | 1,449                           | 1,816                     | 4,803                         | 1,280                           |
|                          | 1,990                    | 4,967                         | 1,471                           | 2,014                     | 4,783                         | 1,263                           |
|                          | 1,917                    | 5,279                         | 1,444                           | 2,023                     | 4,949                         | 1,365                           |
|                          | 1,724                    | 5,183                         | 1,356                           | 2,087                     | 4,787                         | 1,314                           |
| <b>0,75</b>              | 2,633                    | 7,713                         | 1,930                           | 2,947                     | 7,121                         | 1,917                           |
|                          | 3,121                    | 7,670                         | 2,111                           | 2,859                     | 7,613                         | 2,126                           |
|                          | 2,994                    | 7,735                         | 2,093                           | 3,008                     | 7,506                         | 1,947                           |
|                          | 2,789                    | 7,764                         | 1,886                           | 3,052                     | 7,952                         | 1,963                           |
|                          | 2,659                    | 7,275                         | 2,074                           | 3,083                     | 7,535                         | 1,969                           |
| <b>1,00</b>              | 4,328                    | 11,181                        | 2,801                           | 4,308                     | 10,742                        | 2,811                           |
|                          | 3,780                    | 10,663                        | 2,674                           | 3,680                     | 10,575                        | 2,489                           |
|                          | 3,950                    | 9,825                         | 2,758                           | 4,313                     | 10,170                        | 2,734                           |
|                          | 4,194                    | 10,470                        | 2,992                           | 4,007                     | 10,729                        | 2,722                           |
|                          | 4,233                    | 9,910                         | 2,926                           | 3,993                     | 10,880                        | 2,849                           |
| <b>2,50</b>              | 11,332                   | 25,641                        | 6,792                           | 10,204                    | 24,538                        | 5,994                           |
|                          | 10,408                   | 25,784                        | 6,793                           | 10,215                    | 24,874                        | 6,027                           |
|                          | 10,294                   | 25,754                        | 6,762                           | 10,027                    | 25,303                        | 6,078                           |
|                          | 10,170                   | 25,593                        | 6,457                           | 10,126                    | 26,505                        | 6,106                           |
|                          | 10,288                   | 25,701                        | 6,638                           | 10,170                    | 25,083                        | 6,072                           |
| <b>5,00</b>              | 20,747                   | 50,664                        | 13,486                          | 20,027                    | 49,733                        | 11,995                          |
|                          | 20,771                   | 50,395                        | 13,324                          | 20,371                    | 48,917                        | 11,956                          |
|                          | 20,740                   | 51,583                        | 13,200                          | 20,783                    | 48,316                        | 11,980                          |
|                          | 20,729                   | 53,245                        | 13,133                          | 20,471                    | 49,723                        | 11,925                          |
|                          | 20,770                   | 52,715                        | 13,251                          | 20,605                    | 49,665                        | 11,779                          |

**Cuadro 3:** Datos para el cálculo de precisión intermedia (entre días) en el método y el sistema.

| Método  |                                   |       |       |       |     |                                      |       |       |       |     |                                     |       |       |       |
|---------|-----------------------------------|-------|-------|-------|-----|--------------------------------------|-------|-------|-------|-----|-------------------------------------|-------|-------|-------|
| Día     | Concentración de Aldicarb (µg/ml) |       |       |       | Día | Concentración de Metamidofos (µg/ml) |       |       |       | Día | Concentración de Carbofuran (µg/ml) |       |       |       |
|         | 0,100                             | 0,250 | 2,500 | 5,000 |     | 0,100                                | 0,250 | 2,500 | 5,000 |     | 0,100                               | 0,250 | 2,500 | 5,000 |
| 1       | 0,105                             | 0,247 | 2,454 | 5,050 | 1   | 0,084                                | 0,267 | 2,503 | 4,629 | 1   | 0,099                               | 0,265 | 2,477 | 4,915 |
|         | 0,094                             | 0,240 | 2,484 | 4,985 |     | 0,099                                | 0,219 | 2,484 | 4,950 |     | 0,102                               | 0,244 | 2,456 | 5,036 |
|         | 0,115                             | 0,246 | 2,487 | 5,041 |     | 0,097                                | 0,253 | 2,516 | 4,629 |     | 0,099                               | 0,244 | 2,438 | 4,818 |
|         | 0,095                             | 0,256 | 2,481 | 5,074 |     | 0,118                                | 0,262 | 2,566 | 4,532 |     | 0,096                               | 0,246 | 2,466 | 4,898 |
|         | 0,092                             | 0,268 | 2,493 | 5,054 |     | 0,098                                | 0,255 | 2,435 | 5,024 |     | 0,103                               | 0,243 | 2,488 | 5,069 |
| 2       | 0,090                             | 0,263 | 2,499 | 4,891 | 2   | 0,087                                | 0,238 | 2,434 | 4,929 | 2   | 0,094                               | 0,246 | 2,450 | 4,967 |
|         | 0,106                             | 0,277 | 2,502 | 4,975 |     | 0,094                                | 0,228 | 2,448 | 4,913 |     | 0,101                               | 0,235 | 2,484 | 4,885 |
|         | 0,099                             | 0,239 | 2,456 | 5,075 |     | 0,102                                | 0,243 | 2,469 | 4,923 |     | 0,102                               | 0,244 | 2,527 | 4,825 |
|         | 0,096                             | 0,259 | 2,480 | 4,999 |     | 0,128                                | 0,223 | 2,481 | 4,900 |     | 0,102                               | 0,248 | 2,647 | 4,966 |
|         | 0,104                             | 0,246 | 2,491 | 5,032 |     | 0,098                                | 0,249 | 2,466 | 4,839 |     | 0,107                               | 0,244 | 2,505 | 4,960 |
| Sistema |                                   |       |       |       |     |                                      |       |       |       |     |                                     |       |       |       |
| Día     | Concentración de Aldicarb (µg/ml) |       |       |       | Día | Concentración de Metamidofos (µg/ml) |       |       |       | Día | Concentración de Carbofuran (µg/ml) |       |       |       |
|         | 0,100                             | 0,250 | 2,500 | 5,000 |     | 0,100                                | 0,250 | 2,500 | 5,000 |     | 0,100                               | 0,250 | 2,500 | 5,000 |
| 1       | 0,090                             | 0,237 | 2,496 | 5,074 | 1   | 0,114                                | 0,253 | 2,057 | 4,993 | 1   | 0,087                               | 0,256 | 2,535 | 4,598 |
|         | 0,095                             | 0,274 | 2,746 | 5,088 |     | 0,085                                | 0,244 | 2,540 | 4,948 |     | 0,093                               | 0,267 | 2,453 | 4,709 |
|         | 0,117                             | 0,230 | 2,534 | 5,131 |     | 0,096                                | 0,302 | 2,508 | 4,892 |     | 0,104                               | 0,249 | 2,506 | 4,784 |
|         | 0,091                             | 0,249 | 2,558 | 5,086 |     | 0,105                                | 0,242 | 2,508 | 4,892 |     | 0,102                               | 0,268 | 2,468 | 4,758 |
|         | 0,113                             | 0,228 | 2,516 | 5,006 |     | 0,091                                | 0,242 | 2,424 | 5,036 |     | 0,103                               | 0,248 | 2,418 | 4,883 |
| 2       | 0,097                             | 0,288 | 2,782 | 5,085 | 2   | 0,090                                | 0,281 | 2,521 | 5,045 | 2   | 0,101                               | 0,267 | 2,474 | 4,886 |
|         | 0,092                             | 0,255 | 2,556 | 5,091 |     | 0,100                                | 0,258 | 2,521 | 4,984 |     | 0,101                               | 0,251 | 2,488 | 4,860 |
|         | 0,099                             | 0,298 | 2,528 | 5,083 |     | 0,096                                | 0,251 | 2,509 | 4,937 |     | 0,100                               | 0,258 | 2,485 | 4,975 |
|         | 0,100                             | 0,248 | 2,498 | 5,080 |     | 0,096                                | 0,264 | 2,394 | 4,912 |     | 0,093                               | 0,244 | 2,469 | 5,135 |
|         | 0,107                             | 0,243 | 2,527 | 5,090 |     | 0,111                                | 0,248 | 2,463 | 4,956 |     | 0,102                               | 0,250 | 2,480 | 5,084 |

**Cuadro 4:** Datos para el cálculo de precisión intermedia (entre analistas) en el método y el sistema.

| Método   |                                   |       |       |       |          |                                      |       |       |       |          |                                     |       |       |       |
|----------|-----------------------------------|-------|-------|-------|----------|--------------------------------------|-------|-------|-------|----------|-------------------------------------|-------|-------|-------|
| Analista | Concentración de Aldicarb (µg/ml) |       |       |       | Analista | Concentración de Metamidofos (µg/ml) |       |       |       | Analista | Concentración de Carbofuran (µg/ml) |       |       |       |
|          | 0,100                             | 0,250 | 2,500 | 5,000 |          | 0,100                                | 0,250 | 2,500 | 5,000 |          | 0,100                               | 0,250 | 2,500 | 5,000 |
| 1        | 0,105                             | 0,247 | 2,454 | 5,050 | 1        | 0,084                                | 0,267 | 2,503 | 4,629 | 1        | 0,099                               | 0,265 | 2,477 | 4,915 |
|          | 0,094                             | 0,240 | 2,484 | 4,985 |          | 0,099                                | 0,219 | 2,484 | 4,950 |          | 0,102                               | 0,244 | 2,456 | 5,036 |
|          | 0,115                             | 0,246 | 2,487 | 5,041 |          | 0,097                                | 0,253 | 2,516 | 4,629 |          | 0,099                               | 0,244 | 2,438 | 4,818 |
|          | 0,095                             | 0,256 | 2,481 | 5,074 |          | 0,118                                | 0,262 | 2,566 | 4,532 |          | 0,096                               | 0,246 | 2,466 | 4,898 |
|          | 0,092                             | 0,268 | 2,493 | 5,054 |          | 0,098                                | 0,255 | 2,435 | 5,024 |          | 0,103                               | 0,243 | 2,488 | 5,069 |
| 2        | 0,131                             | 0,243 | 2,536 | 4,979 | 2        | 0,088                                | 0,257 | 2,449 | 4,921 | 2        | 0,096                               | 0,258 | 2,459 | 5,023 |
|          | 0,092                             | 0,256 | 2,507 | 5,027 |          | 0,098                                | 0,251 | 2,437 | 4,984 |          | 0,092                               | 0,253 | 2,464 | 4,953 |
|          | 0,083                             | 0,253 | 2,492 | 5,087 |          | 0,109                                | 0,239 | 2,556 | 5,029 |          | 0,099                               | 0,254 | 2,513 | 4,900 |
|          | 0,100                             | 0,253 | 2,520 | 5,071 |          | 0,100                                | 0,259 | 2,518 | 5,012 |          | 0,109                               | 0,249 | 2,438 | 4,932 |
|          | 0,095                             | 0,255 | 2,451 | 5,052 |          | 0,108                                | 0,238 | 2,563 | 5,037 |          | 0,098                               | 0,260 | 2,447 | 4,865 |
| Sistema  |                                   |       |       |       |          |                                      |       |       |       |          |                                     |       |       |       |
| Analista | Concentración de Aldicarb (µg/ml) |       |       |       | Analista | Concentración de Metamidofos (µg/ml) |       |       |       | Analista | Concentración de Carbofuran (µg/ml) |       |       |       |
|          | 0,100                             | 0,250 | 2,500 | 5,000 |          | 0,100                                | 0,250 | 2,500 | 5,000 |          | 0,100                               | 0,250 | 2,500 | 5,000 |
| 1        | 0,090                             | 0,237 | 2,496 | 5,074 | 1        | 0,114                                | 0,253 | 2,057 | 4,993 | 1        | 0,087                               | 0,256 | 2,535 | 4,598 |
|          | 0,095                             | 0,274 | 2,746 | 5,088 |          | 0,085                                | 0,244 | 2,540 | 4,948 |          | 0,093                               | 0,267 | 2,453 | 4,709 |
|          | 0,117                             | 0,230 | 2,534 | 5,131 |          | 0,096                                | 0,302 | 2,508 | 4,892 |          | 0,104                               | 0,249 | 2,506 | 4,784 |
|          | 0,091                             | 0,249 | 2,558 | 5,086 |          | 0,105                                | 0,242 | 2,508 | 4,892 |          | 0,102                               | 0,268 | 2,468 | 4,758 |
|          | 0,113                             | 0,228 | 2,516 | 5,006 |          | 0,091                                | 0,242 | 2,424 | 5,036 |          | 0,103                               | 0,248 | 2,418 | 4,883 |
| 2        | 0,082                             | 0,264 | 2,502 | 4,998 | 2        | 0,098                                | 0,257 | 2,542 | 4,722 | 2        | 0,098                               | 0,254 | 2,465 | 4,848 |
|          | 0,096                             | 0,255 | 2,431 | 5,311 |          | 0,086                                | 0,241 | 2,458 | 5,030 |          | 0,092                               | 0,262 | 2,428 | 4,958 |
|          | 0,082                             | 0,227 | 2,485 | 5,000 |          | 0,111                                | 0,249 | 2,495 | 5,071 |          | 0,102                               | 0,253 | 2,420 | 5,053 |
|          | 0,139                             | 0,257 | 2,482 | 4,966 |          | 0,088                                | 0,282 | 2,452 | 5,039 |          | 0,112                               | 0,247 | 2,417 | 4,961 |
|          |                                   | 0,253 | 2,508 | 5,042 |          | 0,110                                | 0,250 | 2,519 | 4,640 |          | 0,090                               | 0,248 | 2,466 | 4,719 |

## E. Anexo: Fórmulas para cálculos de los parámetros de validación

### Repetibilidad y precisión intermedia

Coefficiente de variación (CV):  $CV = \frac{S}{x} * 100$

Donde, S es la desviación estándar y X el promedio.

Análisis estadístico de perfiles para medias repetidas:

Para el análisis de diferencia significativa entre los días y los analistas.

La prueba de hipótesis que se planteada para apoyar y constatar lo encontrado, en los gráficos de perfiles es:

$$H_0: \mu_{T1} = \mu_{T2} = \mu_{T3}$$

Para esto se asume que:

Sea  $y_{hi} = (y_{hi1}, \dots, y_{hit})^t$ , denota el vector de observaciones para el i-ésimo grupo, en este caso  $i = 1; 2; 3$ . Se supone que las observaciones en este vector son independientes y tienen una distribución normal con media  $\mu_{T1}$ ,  $\mu_{T2}$  o  $\mu_{T3}$  según sea el caso, y matriz de varianza y covarianza  $\Sigma$  para todos los grupos. Dado que este supuesto no se cumple, y que el número de observaciones por concentración y por tratamiento es limitado no es posible abordar esta prueba desde la teoría convencional, por lo tanto se hace necesario realizar una prueba no paramétrica.

Sea N el número total de observaciones en todas las muestras combinadas, t el número de muestras,  $R_i$  la suma de rangos de la muestra i,  $n_i$  el número de observaciones en la i-ésima muestra. El estadístico de prueba es:

$$H = \left( \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^t R_i^2 \right) - 3(N+1)$$

Si  $H_0$  es cierta la distribución de  $H$  se aproxima a una chi-cuadrado con  $t - 1$  grados de libertad; de forma que se rechaza la hipótesis nula para valores de  $F$  superiores al valor crítico para el nivel de significación fijado. El estadístico de prueba  $H$  es básicamente una medida de la varianza de la sumas de rangos  $R_1; R_2; R_3$ . Entonces solo cuando el valor de  $H$  sea grande se rechaza la hipótesis nula de que las muestras vienen de poblaciones similares.

## Linealidad

Modelo de Regresión lineal  $y = a + bx$

Los valores estimados de  $a$  y  $b$  del modelo de mínimos cuadrados se obtienen de las fórmulas:

$$b = \frac{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i y_i}{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2}$$

$$a = \frac{\sum w_i x_i^2 \cdot \sum w_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i x_i y_i}{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2}$$

$$r = \frac{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i y_i}{\sqrt{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \cdot \sqrt{\sum w_i \cdot \sum w_i y_i^2 - (\sum w_i y_i)^2}}$$

Donde  $x_i$  y  $y_i$  son el  $i$ -ésimo par de datos de los  $n$  par de datos totales.

$w_i$  es el factor de ponderación elegido.

Factor de ponderación:  $w_i = \frac{1}{x_i^2}$

## Prueba de t para la correlación

$H_0$ : no existe correlación entre  $x - y$

$H_1$ : existe correlación entre  $x - y$

Probabilidad de error  $p = 0,05$  para una distribución de dos colas ( $\alpha/2$ )

Grados de libertad =  $n-2$ , siendo  $n = k * c$ , donde  $k$ : niveles y  $c$ : réplicas

$t$  experimental para el coeficiente de correlación (tr):  $t_r = \frac{|r| \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$

Criterio de aceptación: Si  $t_r > t_{tab}$  entonces se rechaza  $H_0$ , existe correlación lineal significativa.

### Prueba de t para el intercepto

$H_0: b = 0$

$H_1: b \neq 0$

Probabilidad de error  $p = 0,05$  para una distribución de dos colas ( $\alpha/2$ )

Grados de libertad =  $n-2$ , siendo  $n = k * c$ , donde  $k$ : niveles y  $c$ : réplicas

t experimental para el intercepto ( $t_b$ ):  $t_b = \frac{b}{S_b}$

Donde,

$b$ : intercepto de la curva

$S_b$ : desviación estándar del intercepto

Criterio de aceptación: Si  $t_b < t_{tab}$  entonces no se rechaza  $H_0$ , el intercepto no es significativamente diferente de cero.

### Límites de confianza

Límites de confianza para el intercepto (LCb):  $LCb = b \pm t_{(n-2)} \times S_b$

Desviación estándar del intercepto ( $S_b$ ):  $S_b = S_{yxw} \times \sqrt{\left(\frac{\sum_i w_i x_i^2}{(\sum_i w_i \sum_i w_i x_i^2 - (\sum_i w_i x_i)^2)}\right)}$

Donde,  $n = \text{número de datos}$

$$S_{yxw} = \sqrt{\frac{\sum_i w_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

Donde,  $\hat{y}_i$  es el  $y$  estimado del modelo lineal.

### Prueba de t para la pendiente

$H_0: m = 0$

$H_1: m \neq 0$

Probabilidad de error  $p = 0,05$  para una distribución de dos colas ( $\alpha/2$ )

Grados de libertad =  $n-2$ , siendo  $n = k * c$ , donde  $k$ : niveles y  $c$ : réplicas

t experimental para la pendiente ( $t_m$ ):  $t_m = \frac{m}{S_m}$

Criterio de decisión: Si  $t_m > t_{tab}$  entonces se rechaza  $H_0$ , la pendiente es significativamente diferente de cero.

*Límites de confianza*

Límites de confianza para la pendiente (LCm):  $LCm = m \pm t_{(n-2)} \times S_m$

Desviación estándar de la pendiente ( $S_m$ ):

$$S_m = \frac{S_{yxw}}{\sqrt{\sum_i w_i \left( x_i - \frac{\sum_i w_i x_i}{\sum_i w_i} \right)^2}}$$

## F. Anexo: Casos forenses asociados con los plaguicidas en estudio

| <b>Aldicarb</b>   |             |             |                    |                         |
|-------------------|-------------|-------------|--------------------|-------------------------|
| <b>Caso No</b>    | <b>Edad</b> | <b>Sexo</b> | <b>Procedencia</b> | <b>Manera de muerte</b> |
| 1                 | 54          | Masculino   | Cundinamarca       | Suicidio                |
| 2                 | 70          | Masculino   | Cundinamarca       | Suicidio                |
| 3                 | 54          | Masculino   | Cundinamarca       | En estudio              |
| 4                 | 22          | Masculino   | Bogotá             | Suicidio                |
| 5                 | 25          | Masculino   | Bogotá             | Suicidio                |
| 6                 | 18          | Masculino   | Bogotá             | Suicidio                |
| 7                 | 17          | Femenino    | Bogotá             | Suicidio                |
| <b>Carbofuran</b> |             |             |                    |                         |
| <b>Caso No</b>    | <b>Edad</b> | <b>Sexo</b> | <b>Procedencia</b> | <b>Manera de muerte</b> |
| 8                 | 15          | Femenino    | Boyacá             | Suicidio                |
| 9                 | 50          | Masculino   | Cundinamarca       | Homicidio               |
| 10                | 17          | Masculino   | Boyacá             | Suicidio                |
| 11                | 23          | Femenino    | Boyacá             | Suicidio                |
| 12                | 49          | Masculino   | Cundinamarca       | Homicidio               |
| 13                | 44          | Masculino   | Boyacá             | Suicidio                |
| 14                | 29          | Masculino   | Boyacá             | Violenta sin determinar |
| 15                | 40          | Femenino    | Boyacá             | Violenta sin determinar |
| 16                | 24          | Masculino   | Cundinamarca       | Homicidio               |
| 17                | 46          | Masculino   | Cundinamarca       | Suicidio                |
| 18                | 31          | Femenino    | Cundinamarca       | Suicidio                |
| 19                | 17          | Femenino    | Boyacá             | Suicidio                |
| 20                | 47          | Femenino    | Cundinamarca       | Suicidio                |
| 21                | 38          | Femenino    | Cundinamarca       | Suicidio                |
| 22                | 32          | Masculino   | Cundinamarca       | Suicidio                |
| 23                | 14          | Femenino    | Cundinamarca       | Suicidio                |
| 24                | 37          | Masculino   | Cundinamarca       | Suicidio                |
| 25                | 51          | Femenino    | Bogotá             | Suicidio                |
| 26                | 47          | Femenino    | Bogotá             | Suicidio                |

| <b>Metamidofos</b> |             |             |                    |                         |
|--------------------|-------------|-------------|--------------------|-------------------------|
| <b>Caso No</b>     | <b>Edad</b> | <b>Sexo</b> | <b>Procedencia</b> | <b>Manera de muerte</b> |
| <b>27</b>          | menor a 18  | Masculino   | Cundinamarca       | En estudio              |
| <b>28</b>          | mayor a 18  | Femenino    | Boyacá             | Violenta sin determinar |
| <b>29</b>          | mayor a 18  | Masculino   | Boyacá             | Violenta sin determinar |
| <b>30</b>          | 49          | Masculino   | Boyacá             | Suicidio                |
| <b>31</b>          | 19          | Masculino   | Cundinamarca       | Violenta sin determinar |
| <b>32</b>          | 78          | Masculino   | Cundinamarca       | Violenta sin determinar |
| <b>33</b>          | 17          | Masculino   | Cundinamarca       | Violenta sin determinar |
| <b>34</b>          | 39          | Masculino   | Cundinamarca       | Violenta sin determinar |