

	<p>DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACION JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA</p> <p>Determinación cualitativa de bupiridilos en formulaciones agrícolas y bebidas</p>	<p>PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN NORMADO ESPECIFICO</p> <p>P-DCF-ECT-QUI-041</p>
	<p>VERSION: 04</p> <p>Rige desde: 18/10/2023</p>	<p>PAGINA: 1 de 13</p>

<p>Elaborado o modificado por:</p> <p>M Sc Manuel Oreamuno Zepeda Perito Judicial 2</p> <p>Dipl. Susana Alfaro Soto Técnico Especializado 6</p>	<p>Revisado por Líder Técnico:</p> <p>M Sc. Jorge Cartín Elizondo Líder Técnico</p>
<p>Visto Bueno Encargado de Calidad:</p> <p>Licda. Ginnette Amador Godoy Encargado de Calidad</p>	<p>Aprobado por:</p> <p>Licda. Patricia Fallas Meléndez Jefatura, Sección de Química Analítica</p>

CONTROL DE CAMBIOS A LA DOCUMENTACIÓN

Versión	Fecha de Aprobación	Fecha de Revisión	Descripción del Cambio	SCD	Solicitado por
01	15/11/2010	14/12/2015	Versión Inicial del Procedimiento	N/A	PFM
02	14/12/2015	17/04/2020	Se retira material vegetal del alcance del PON, se agregan las bandas de identificación por FTIR, se cambia el uso de cloroformo por diclorometano	N/A	PFM
03	17/04/2020	18/10/2023	Actualización de formato, se incluye modificaciones producto de la validación, se elimina prueba HPLC	05-20	PFM
04	18/10/2023		Revisión Trianual, se incluye paso de preparación previo para inactivación de puntas y cristalería. Cambios en los pasos del procedimiento.	05-23	PFM

**ESTE PROCEDIMIENTO ES UN DOCUMENTO CONFIDENCIAL
PARA USO INTERNO DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES
SE PROHÍBE CUALQUIER REPRODUCCIÓN QUE NO SEA PARA ESTE FIN**

	<p>DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACION JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA</p> <p>Determinación cualitativa de bupiridilos en formulaciones agrícolas y bebidas</p>	<p>PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN NORMADO ESPECIFICO</p> <p>P-DCF-ECT-QUI-041</p>
VERSION: 04	Rige desde: 18/10/2023	PAGINA: 2 de 13

La versión oficial digital es la que se mantiene en la ubicación que la Unidad de Gestión de Calidad defina. La versión oficial impresa es la que se encuentra en la Unidad de Gestión de Calidad. Cualquier otro documento impreso o digital será considerado como copia no controlada

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 3 de 13
Determinación cualitativa de bupiridilos en formulaciones agrícolas y bebidas		P-DCF-ECT-QUI-041

1 Objetivo:

Identificar paraquat y de diquat en formulaciones agrícolas y en bebidas adulteradas.

2 Alcance:

Este procedimiento describe la metodología a utilizar para la identificación de paraquat o diquat en formulaciones agrícolas, en diluciones acuosas de éstas y en bebidas adulteradas no azucaradas.

La metodología permite la identificación de uno de los dos bupiridilos cuando el ingrediente activo de la formulación es el paraquat o el diquat; pero no cuando se encuentran combinados. La determinación cualitativa se realiza mediante la prueba de color de ditionito de sodio, por UV y por FTIR-ATR.

3 Referencias:

3.1 AOAC Official Method 969.08 7.4.04 Diquat in Pesticide Formulations, and Method 969.09 7.4.06 Paraquat in Pesticide Formulations, published on Horwitz, W. & Latimer, G.W. (editors) Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th edition, 2005, current through revision 4, 2011.

3.2 Informe de Validación, Determinación cualitativa de paraquat y diquat en formulaciones agrícolas por la prueba de color de ditionito de sodio, por espectrofotometría UV y por espectrometría FTIR-ATR. 029-QUI-DCF-2019.

3.3 Moffat, A.C.; Osselton, M.D.; Widdop, B. & Watts. J. (editors) Clarke´s Analysis of Drugs and Poisons 4th edition, Pharmaceutical Press, London & Chicago: 2011, Vol 1, pps 273 y 487; Vol 2, pps: 1280, 1281, 1860-1863.

4 Equipos y Materiales:

4.1 Equipo instrumental:

- agitador de vórtice estándar con regulador de la intensidad de agitación o similar.
- balanza granataria (rango de 0,01 g a 500 g; menor división 0,01 g) o similar.
- balanza analítica (rango de 0,0001 g a 20,000 g; menor división 0,0001g) o similar.
- centrífuga para tubos de 15 mL que permita centrifugar a > 3000 rcf con temporizador o similar.
- espectrofotómetro UV visible que permita generar un espectro ultravioleta entre 210 nm y 350 nm, Varian Cary 50 conc.
- espectrómetro FTIR-ATR que permita generar un espectro infrarrojo entre 4000 cm⁻¹ y 525 cm⁻¹, Thermo Nicolet iS5 con accesorio de ATR de diamante.
- estufa convencional de laboratorio que permita llegar a 110 °C ± 5 °C
- plantilla eléctrica de calentamiento, estándar de laboratorio o similar

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 4 de 13
Determinación cualitativa de biperidilos en formulaciones agrícolas y bebidas		P-DCF-ECT-QUI-041

4.2 Materiales y Cristalería:

- beaker de diferente capacidad
- espátulas
- guantes desechables de nitrilo
- jeringas plásticas con filtro de 0,45 μm
- lentes de seguridad
- papel secante
- perlas de ebullición
- tubos cónicos de extracción, de polipropileno de 15 mL
- tubos de ensayo de vidrio de 10 mL

5 Reactivos y Materiales de Referencia:

5.1 Reactivos:

- ácido clorhídrico, grado reactivo
- agua destilada o desionizada
- carbón activado, grado reactivo lavado con HCl Sigma C4386 o similar
- diclorometano, grado reactivo o superior
- disolución de ditionito de sodio 1 % en NaOH 1,0 M preparado fresco (Ver preparación en anexo 01)
- disolución de hidróxido de sodio 3,0 M (Ver preparación en anexo 01)
- ditionito de sodio, grado reactivo
- etanol 95%, grado reactivo
- hidróxido de sodio, grado reactivo

Nota No. 1: El ditionito de sodio sólido (también denominado hidrosulfito o hiposulfito de sodio) es inestable en presencia de humedad, por lo que debe mantenerse en una desecadora al vacío con desecante.

5.2 Materiales de referencia:

- diquat dibromuro monohidrato, estándar analítico sólido, pureza > 90%
- paraquat dicloruro (metilviologen), estándar analítico sólido, pureza > 90%

Nota No. 2: Los materiales de referencia deberán almacenarse en refrigeración ($2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$) $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en una desecadora. El material de referencia de paraquat requiere secarse en una estufa $110\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$, previo a su utilización. Esto es especialmente importante si el espectro FTIR no cumple con los criterios de la hoja de control.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 5 de 13
Determinación cualitativa de bupiridilos en formulaciones agrícolas y bebidas		P-DCF-ECT-QUI-041

6 Condiciones Ambientales:

No.	Condición ambiental	Valor mínimo	Valor máximo	Otras características
6.1	Temperatura	15°C	35 °C	En el cuarto de espectroscopía la temperatura debe medirse una vez durante la jornada laboral
6.2	Humedad	20 %	80 %	En el cuarto de espectroscopía la temperatura debe medirse una vez durante la jornada laboral

7 Procedimiento:

7.1 Prepare la cantidad suficiente de una disolución de NaOH 3M en un recipiente plástico para ir colocando las puntas, tubos y cristalería para la inactivación en un tarro para los desechos. Posteriormente limpiarse con agua y jabón lo más pronto posible para evitar la contaminación del ambiente y del personal. Descarte los restos de las disoluciones en NaOH 3 M para inactivar.

7.2 Controles mínimos:

7.2.1 Trate las muestras cuestionadas y cualquier muestra control recibida de la misma manera.

7.2.2 Realice siempre el análisis de un blanco de reactivos en la determinación colorimétrica. Si la cantidad de preparaciones excede las 12, realice un blanco adicional y así por cada docena.

7.2.3 Realice el análisis de un control positivo (material de referencia directo) en todas las pruebas.

7.2.4 Registre estos resultados en el grupo de análisis "QTV – bupiridilos" de la funcionalidad "Registro de datos y resultados de los análisis".

7.3 Preparación de la muestra cuestionada:

7.3.1 Formulaciones agrícolas: Agregue aprox. 200 uL de la muestra cuestionada de formulación en un tubo de 15 mL. Agregue 2 ml de agua destilada y seguidamente 10 gotas de HCl conc. Tape y agite por aprox. 30 s.

Nota No. 3: En el caso de algunas formulaciones de paraquat que son de color verde malaquita se deberá observar un cambio de coloración hacia un amarillo y en el caso de algunas formulaciones del diquat que son de color café oscuro, puede no ser apreciable un cambio de color en este punto.

7.3.2 Diluciones acuosas o bebidas adulteradas: Agregue aprox. 1 mL a 2 mL de dilución acuosa o bebida adulterada en un tubo de 15 mL. Ajuste el volumen a 2 mL totales con agua desionizada de ser necesario. Agregue 10 gotas de HCl conc. Tape y agite por aprox. 30 s.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 6 de 13
Determinación cualitativa de biperidilos en formulaciones agrícolas y bebidas	P-DCF-ECT-QUI-041	

7.3.3 Limpie dos veces la disolución acidificada de las muestras cuestionadas con aprox. 2 mL de diclorometano, agitando en el vórtex por aprox. 2 min y descartando siempre la fase orgánica (inferior). Centrifugue, de ser necesario a 3000 rcf por 5 min.

7.3.4 Agregue al tubo: aprox. 2 mL de etanol 95%, una punta de espátula (aprox. 0.1 gramos) de carbón activado (si es posible colocado en un trozo de papel encerado para evitar la estática) y unas perlas de ebullición.

7.3.5 Caliente suavemente (aprox. 80 °C) en baño maría por 10 min o hasta que el carbón decolore la disolución (CUIDADO no caliente muy fuerte pues salpica).

7.3.6 Permita enfriar y centrifugue a al menos 5000 rpm por aprox. 10 min.

Nota No. 4: Si esta disolución sigue de tono verde, se puede repetir el proceso de limpieza con carbón activado.

7.3.7 Trasvase el líquido a un tubo de 15 mL. Esta se denominará en adelante "disolución de prueba".

7.3.8 Los esquemas analíticos para realizar son: determinación colorimétrica y determinación por FTIR-ATR o determinación por UV y determinación por FTIR-ATR. Preguntar al perito el esquema analítico a utilizar.

7.4 Determinación colorimétrica:

7.4.1 Agregue, en un tubo de ensayo al menos 10 uL de la "disolución de prueba" y agregue aprox. 1 mL de agua desionizada. Seguidamente agregue aprox. 1 mL de la disolución de ditionito de sodio 1% en NaOH 1,0 M.

7.4.2 Registre los resultados en el SADCF, en el grupo de análisis "QTV - biperidilos" de la funcionalidad "Registro de datos y resultados de los análisis".

Nota No. 5: La formación de una coloración azul es indicativo de la presencia de paraquat y la formación de una coloración verde claro es indicativo de la presencia de diquat.

7.5 Determinación por UV:

7.5.1 Configure el equipo para que realice la medición del espectro UV entre 210 nm y 350 nm, en el modo de barrido "Lento" (equivalente a una velocidad de barrido de 300 nm/min y un intervalo de datos de 0,50 nm), en modo "Haz doble" y aplicando la "corrección línea base".

7.5.2 Limpie la celda y ejecute la medición de la línea de fondo "background" con agua desionizada.

7.5.3 Mida el blanco de reactivos como control negativo, empleando agua desionizada como disolvente.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 7 de 13
Determinación cualitativa de bupiridilos en formulaciones agrícolas y bebidas	P-DCF-ECT-QUI-041	

7.5.4 Mida una dilución de la “disolución de prueba”, empleando agua desionizada como disolvente. Registre la medición de un blanco de celda entre cada medición.

7.5.5 Mida una pequeña cantidad de los cristales del material de referencia, empleando agua como disolvente. Registre la medición de un blanco de celda entre cada medición.

7.5.6 Verifique que cada espectro obtenido (muestras cuestionadas y material de referencia) presente los máximos de absorción (Ver Cuadro I) entre un valor de 0,05 uA y 1,0 uA. Para esto concentre o diluya con agua destilada según corresponda.

7.5.7 Obtenga para cada espectro, con el software del equipo, el valor de longitud de onda para las bandas de absorción más cercanas a los valores, según se indica en el siguiente cuadro:

Cuadro I: Bandas de absorción características en el UV

analito	Longitud de onda máximos de absorción en nm/ ± 2 nm
paraquat	257
diquat	309

7.5.8 Evalúe los resultados obtenidos con los criterios de aceptación y rechazo que se establecen en el apartado 8.

7.5.9 Genere el reporte en pdf, firme e incorpore al legajo digital de cada caso.

Nota No. 6: El reporte del espectro de cada muestra cuestionada, blanco de reactivos y el material de referencia debe incluir el espectro del blanco de celda correspondiente.

7.5.10 Registre los resultados en el SADCF, en el grupo de análisis “QTV - bupiridilos” de la funcionalidad “Registro de datos y resultados de los análisis”.

7.6 Determinación por FTIR-ATR:

7.6.1 Agregue al resto de la “disolución de prueba” del apartado 7.2.7, aprox. 10 mL de etanol 95%.

7.6.2 Caliente con las perlas de ebullición, para eliminar progresivamente por evaporación el agua del azeótropo y conforme se va reduciendo el volumen de la disolución agregue etanol 95%. Repita esto hasta que al evaporar se obtenga un sólido seco.

7.6.3 Lleve a sequedad sobre una plantilla eléctrica, teniendo cuidado que no se queme el residuo sólido. El residuo sólido obtenido podrá presentar una coloración blanca, amarilla o café muy claro.

Nota No. 7: Si se observan húmedos los cristales de la muestra cuestionada se pueden secar en el horno a 110 °C. En el caso de material de referencia de paraquat, se recomienda calentar en el horno a 110 °C por tres horas.

7.6.4 Mida tanto el sólido de la preparación de cada muestra cuestionada, así como el sólido del material de referencia directo, en el FTIR-ATR entre 525 cm⁻¹ y 4000 cm⁻¹ realizando 32

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 8 de 13
Determinación cualitativa de bipiridilos en formulaciones agrícolas y bebidas	P-DCF-ECT-QUI-041	

repeticiones con una resolución de 4 cm⁻¹ y aplicando la corrección ATR.

Nota No. 8: Es posible realizar la comparación espectral contra un material de referencia de leído anteriormente siempre y cuando sea en el mismo FTIR y se logre demostrar la reproducibilidad de la posición de las bandas en el tiempo. Esto se logra con la evaluación del comportamiento del material de referencia de poliestireno.

7.6.5 Ejecute en el software del equipo, para los espectros obtenidos, la corrección de línea de fondo y muestre los espectros como porcentaje de transmitancia en el eje de las ordenadas.

7.6.6 Obtenga para cada espectro, con el software del equipo, el valor de número de onda para las bandas de absorción más cercanas a los valores, según se indica en el siguiente cuadro:

Cuadro II: Bandas de absorción características en el FTIR:

Analito	Bandas de absorción características en cm ⁻¹ / ±4,0 cm ⁻¹
paraquat	1644, 1571, 1516, 1238, 1194 y 1456
diquat	1495, 1373, 1191, 1134, 789 y 711

7.6.7 Evalúe los resultados obtenidos con los criterios de aceptación y rechazo que se establecen en el apartado 8.

7.6.8 Genere el reporte en formato pdf, firme e incorpore al legajo digital de cada caso.

Nota No. 9: El reporte del espectro de cada muestra cuestionada y el material de referencia debe incluir la tabla de picos.

7.6.9 Registre los resultados en el SADCF, en el grupo de análisis "QTV - bipiridilos" de la funcionalidad "Registro de datos y resultados de los análisis".

8 Criterios de Aceptación o Rechazo de Resultados:

8.2 Un resultado se considerará positivo por paraquat en la muestra cuestionada siempre y cuando se cumplan los siguientes criterios:

Cuadro III: Criterios de aceptación y rechazo de los resultados:

No.	Criterio de Aceptación	Valor Límite	Corrección Aplicable
1	Que el blanco de reactivos, en la determinación colorimétrica, no presente coloración	El blanco de reactivos no debe presentar coloración	Prepare nuevamente
2	Que la coloración de "disolución para prueba de color" generada en la determinación colorimétrica para la muestra cuestionada genere una coloración azul igual que la generada por el material de referencia	La coloración generada es de un tono azul para el paraquat y verde claro para el diquat	Prepare nuevamente
3	Que el espectro ultravioleta del blanco de celda antes de cada lectura no presente absorción en el UV	Que no presente las bandas de absorción a la longitud de onda del analito a reportar en un valor superior a 0,05 uA.	Limpie la celda con agua

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 9 de 13
Determinación cualitativa de biperidilos en formulaciones agrícolas y bebidas	P-DCF-ECT-QUI-041	

		Ver longitudes de onda máximas de absorción características en el Cuadro I.	
4	Que el espectro ultravioleta de la preparación de la muestra cuestionada no difiera del espectro del material de referencia. Adicionalmente se evaluará la variabilidad en la longitud de onda máxima de absorción de las bandas características entre la muestra cuestionada y el material de referencia	Sobreposición de espectros Bandas de absorción ± 2 nm (ancho de banda): Ver longitudes de onda máximas de absorción características en el Cuadro I.	No aplica
5	Que el espectro infrarrojo de la preparación de la muestra cuestionada no difiera del espectro del material de referencia. Adicionalmente se evaluará la variabilidad en el número de onda de las bandas características entre la muestra cuestionada y el material de referencia.	Sobreposición de espectros Bandas de absorción características ± 4 cm^{-1} (ancho de banda). Ver bandas de absorción características en el Cuadro II.	No aplica

9 Cálculos y evaluación de la incertidumbre:

N/A

10 Reporte de Análisis y Resultados:

Reporte los resultados en el Dictamen Pericial como se indica seguidamente. La redacción de estos resultados puede ser modificada en caso de ser necesario, siguiendo el criterio del perito.

Para un resultado negativo:

“Bajo la metodología utilizada, en (muestra cuestionada analizada) no se detectó la presencia de herbicidas biperidilos”.

Para un resultado positivo por un biperidilo específico con material de referencia vigente:

“En (muestra cuestionada analizada) se detectó (analito detectado)”.

Para un resultado positivo por un biperidilo específico sin material de referencia o no vigente, por comparación con una base de datos de espectros FTIR:

“En (muestra cuestionada analizada) se detectó una sustancia cuyas propiedades fisicoquímicas evaluadas corresponden con las de (analito detectado) como una identificación preliminar”.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 10 de 13
Determinación cualitativa de bupiridilos en formulaciones agrícolas y bebidas		P-DCF-ECT-QUI-041

11 Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional:

- a) Utilice guantes desechables al manipular las muestras.
- b) Las formulaciones agrícolas con bupiridilos y los materiales de referencia son sustancias ácidas cáusticas para la piel.

12 Simbología:

- aprox.: aproximadamente
- conc.: concentrado
- DCF: Departamento de laboratorios de Ciencias Forenses
- FTIR-ATR o FTIR: espectrometría infrarroja con accesorio de reflectancia total atenuada
- N/A: no aplica
- SCD: solicitud de cambio documental
- UV: espectrofotometría ultravioleta

13 Terminología:

N/A

14 Anexos:

No. de Anexo	Nombre del Anexo
01	Preparación de reactivos
02	Ejemplos de espectros FTIR-ATR de bupiridilos
03	Ejemplos de espectros UV de bupiridilos

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 11 de 13
Determinación cualitativa de bupiridilos en formulaciones agrícolas y bebidas	P-DCF-ECT-QUI-041	

Anexo 1

Preparación de reactivos

Disolución NaOH 3,0 M: mida aprox. 12 g de hidróxido de sodio y disuelva en 100 mL de agua destilada.

Disolución de ditionito de sodio 1% en NaOH 1,0 M: mida aprox. 4,0 g de hidróxido de sodio y disuelva en 100 mL de agua desionizada. Agregue a la disolución anterior aprox. 1,0 g de ditionito de sodio y disuelva. Prepare y utilice fresco. No utilizar esta disolución luego de 3 horas. Descarte el sobrante.

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 12 de 13
Determinación cualitativa de bipiridilos en formulaciones agrícolas y bebidas		P-DCF-ECT-QUI-041

Anexo 2

Ejemplos de espectros FTIR-ATR de bipiridilos

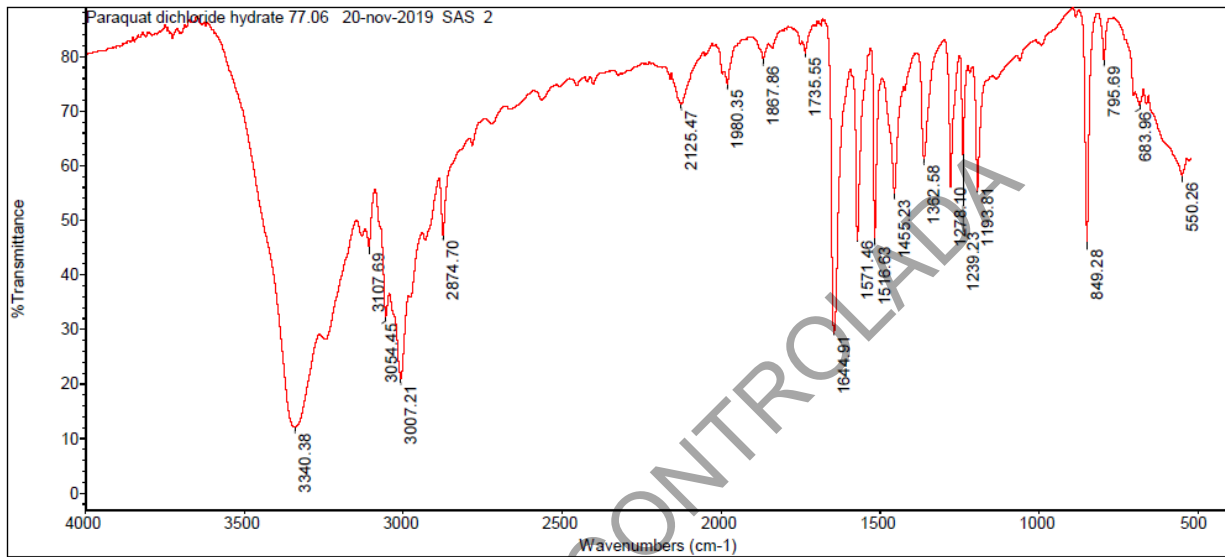


Figura 1: Ejemplo del espectro FTIR-ATR de un material de referencia de paraquat dicloruro

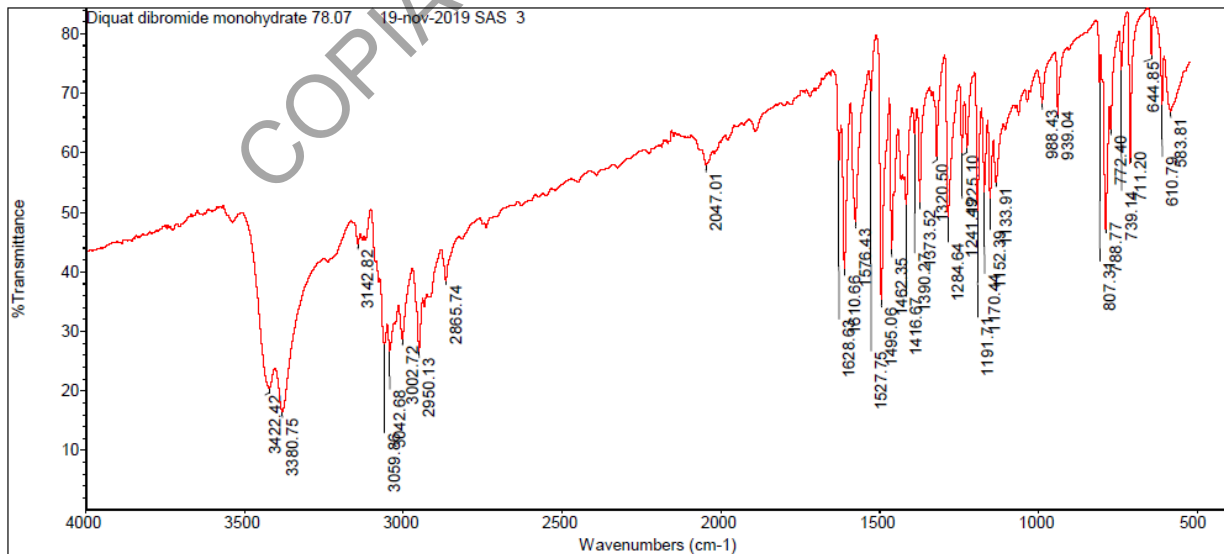


Figura 2: Ejemplo del espectro FTIR-ATR de un material de referencia de diquat dibromuro

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 04	PAGINA: 13 de 13
Determinación cualitativa de bupiridilos en formulaciones agrícolas y bebidas		P-DCF-ECT-QUI-041

monohidrato

Anexo 3

Ejemplos de espectros UV de bupiridilos

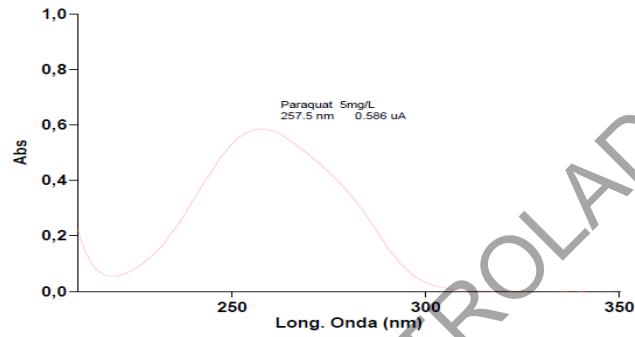


Figura 3: Ejemplo del espectro UV de un material de referencia de paraquat dicloruro

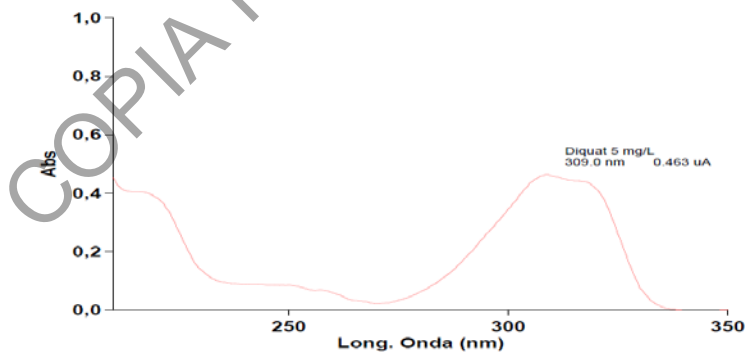


Figura 4: Ejemplo del espectro UV de un material de referencia de diquat dibromuro monohidrato