

 <p>DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA</p> <p><b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPYRIDILO EN MATRICES BIOLÓGICAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA</b></p>	<p>PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN NORMADO ESPECIFICO</p> <p><b>P-DCF-ECT-TOX-017</b></p>
	<p>Versión: 03</p> <p>Rige desde: 24/01/2022</p>

<p><b>Elaborado o modificado por:</b></p> <p><b>Dra. Ma de los Ángeles Sancho Brenes Perito, Sección Toxicología</b></p> <p><b>Dr. Diego Arias Alfaro Jefe, Sección de Toxicología</b></p>	<p><b>Revisado por Líder Técnico:</b></p> <p><b>Dra. María de los Ángeles Sancho Brenes Líder Técnico de Sección/Unidad de Confirmatorios</b></p>
<p><b>Visto Bueno Encargado de Calidad:</b></p> <p><b>Dr. Marco Martínez Esquivel Encargado de Calidad de la Sección de Toxicología</b></p>	<p><b>Aprobado por:</b></p> <p><b>Dr. Diego Arias Alfaro Jefe, Sección de Toxicología</b></p>

### CONTROL DE CAMBIOS A LA DOCUMENTACIÓN

Versión	Fecha de Aprobación	Fecha de Revisión	Descripción del Cambio	SCD	Solicitado por
01	30/11/2010	02/07/2018	Versión Inicial del Procedimiento		GBA
02	02/07/2018	24/01/2022	Se realizaron cambios en el formato y la numeración. En el alcance se definió la matriz para análisis cuantitativo y se incluyeron parámetros de validación. Se actualizaron y agregaron referencias bibliográficas. Se modificaron materiales de la lista. Se modificó del procedimiento: el volumen de elución, las diluciones, se incluyó un balón para la elución. Se eliminó del procedimiento: el reciclaje de la resina, la lectura cualitativa de diquat, la prueba cualitativa en orina. Se cambió el orden de los anexos	013-2018	DAA

 <p>DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACIÓN JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA</p> <p><b>DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPYRIDILOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA</b></p>	<p>PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN NORMADO ESPECIFICO</p> <p><b>P-DCF-ECT-TOX-017</b></p>
	<p>Versión: 03</p> <p>Rige desde: 24/01/2022</p>

03	24/01/2022		Se incorpora anexo con ejemplo de estimación de incertidumbre. Se incluye homogeneizador con dispersores desechables	01-2022	DAA

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

**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 03	PAGINA: 3 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPIRIDILOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	

## 1. Objetivo:

El objetivo de este PON es establecer un procedimiento para la determinación de bupiridilos en muestras de origen biológico en la Sección de Toxicología del Departamento de Ciencias Forenses del O.I.J. de Costa Rica.

## 2. Alcance:

Este procedimiento se aplica para la extracción y detección cualitativa (diquat y paraquat) así como cuantitativa (paraquat) de bupiridilos en riñón en casos post-mortem que ingresan a la Sección de Toxicología del DCF. Los Bupiridilos analizados son el paraquat y el diquat; sin embargo, las intoxicaciones con paraquat son mucho más comunes que las intoxicaciones con diquat, de hecho, el diquat es una sustancia que está en desuso, aunque se ha detectado esporádicamente su presencia en algunos casos.

Para la determinación de bupiridilos la muestra de elección para realizar el análisis, es el riñón ya que el tóxico se concentra en esta matriz y por eso los parámetros de desempeño del método han sido calculados específicamente para muestras de riñón.

Se requiere idealmente de 10 g de riñón para realizar el análisis.

Para la cuantificación se realiza una curva de calibración en matriz de manera que las pérdidas de analito y los efectos de matriz se cancelan y se logra que el método tenga la sensibilidad requerida para detectar bupiridilos incluso en casos con hospitalizaciones prolongadas después de la intoxicación.

La metodología presenta los siguientes parámetros de validación:

Nombre del parámetro de validación	Valor obtenido del parámetro	Criterio de aceptación y rechazo
Linealidad	Intervalo lineal de 1 a 50 µg/g de paraquat en riñón. Coeficiente de determinación: > 0,99 F de ANOVA: Ajuste adecuado con probabilidad de 0,05	Se acepta la linealidad hasta 50 µg/ g de riñón. Coeficiente de determinación: > 0,99 F de ANOVA: Ajuste adecuado con probabilidad de 0,05
Límite de detección y Límite de Cuantificación	Límite de detección (LD): 0,3 µg/g de riñón  Límite de cuantificación (LC): 1,0 µg/g de riñón	LD Valor menor al sugerido, se establece que el LD es de 0,3 µg/g de riñón.  LC Valor menor al sugerido, se establece que el valor es de 1,0 µg/g.
Eficiencia en la recuperación	En riñón humano: condiciones de repetibilidad: (85,74%;101,88%,103,63) RSD 12,67%  En riñón de vaca condiciones de	Valor dentro del parámetro 70% < %Recuperación < 120 % de paraquat en riñón con una precisión <20% RSD.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 4 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPYRIDIOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	

	precisión intermedia: 97,85 %, 99,63% y 100,3%) RSD 14,17 %	
Veracidad	Condiciones de repetibilidad: Riñón humano 5,63 % de sesgo  Condiciones de precisión intermedia: Riñón de vaca 3,42 % de sesgo	< 20 % de sesgo.
Precisión	Condiciones de repetibilidad Riñón: 12,87% RSD  Condiciones de precisión intermedia: Riñón: 14,15% RSD	< 20 % RSD.
Especificidad	No diferencia significativa ( $p=0,05$ ) entre recuperación con y sin interferentes.	No diferencia significativa ( $p=0,05$ ) entre recuperación con y sin interferentes. Se modifica el criterio a < 20 % RSD con base a la literatura consultada, dado que el criterio aplicado F y T según la experiencia es muy estricto.

### 3. Referencias:

- 3.1 Baselt R. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. Eighth Edition, Chemical Toxicology Institute, California, USA, 2008.
- 3.2 Berry D, Grove J. The determination of paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylium cation) in urine. Clinica Chimica Acta. Volume 34, Issue 1, August 1971, Pages 5-11.
- 3.3 Lee S., et al. Level of paraquat in fatal intoxications. International Journal of Legal Medicine. (112)198-200 (1999).
- 3.4 Moffat, A. C. Clarke's Isolation and identification of Drugs, Second edition. The Pharmaceutical Press, 1986.
- 3.5 Reigart J., Roberts J. Reconocimiento y Manejo de los Envenenamientos por Pesticidas. Quinta Edición. United States Environmental Protection Agency (USEPA), EUA, 1999.
- 3.6 Tomlin C. The Pesticide Manual. Tenth Edition, The Royal Society of Chemistry, United Kingdom, 1994.
- 3.7 [Validación y estimación de incertidumbre de la determinación de paraquat en riñón. Informes 003-TOX-VAL-INC-2015 y 004-TOX-INC-2021.](#)

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 5 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPIRIDILOS EN MATRICES BIOLÓGICAS ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	

#### 4. Equipos y Materiales:

Agitador para pastillas magnéticas.

Anteojos de seguridad.

Balanza analítica, rango de 0,00001 a 30 gramos ( $\pm 0,00001$  gramos) y de 30 a 120 gramos ( $\pm 0,0001$  gramos), similar o superior.

Balanza granataria, rango de 0 a 600 g ( $\pm 0,01$  gramos), similar o superior.

Balones aforados de 5 mL y 50 mL.

Bandeja plástica pequeña.

Beaker de 10 mL, 50 mL, 250 mL, 400 mL, 1 L y 2 L.

Bitácora de control de equipo del espectrofotómetro UV-VIS Varian Cary 50 BIO PJ No. 501271.

Botella plástica de 1 L

Botellas de vidrio color ámbar de 500 mL, de 1L y de 2,5 L.

Cámara de bioseguridad tipo I o clase II-B2.

Cámara de desecación al vacío.

Capilla de extracción de gases.

Columnas de vidrio para cromatografía de al menos 100 mL con cierre de teflón y frit de vidrio, marca Kontes o similar.

Congelador ( $<0^{\circ}\text{C}$ ).

Cubetas de cuarzo de 10 mm de paso de luz.

Dispensador de disoluciones de 10 a 100 mL para ácido Brand Dipensette III®.

Embudos plásticos de 8 cm de diámetro.

Erlenmeyer de 4 L.

Espátula acanalada.

Espectrofotómetro ultravioleta visible (UV-VIS) Varian Cary 50 BIO, para cubeta de 1 cm. de paso de luz de sistema óptico de doble haz interno.

Estufa de 100 a 200°C  $\pm 10^{\circ}\text{C}$

Etiquetas adhesivas

[Formulario "Lista de objetos de análisis por plaguicidas Bipiridilos".](#)

Formulario "Registro de preparación de disoluciones".

Formulario "Registro de uso y control de material de referencia".

Formulario "Registro de uso y preparación de disoluciones madre individuales".

[Formulario "Reporte de bipiridilos", versión vigente.](#)

[Formulario de análisis en serie de bipiridilos, versión vigente.](#)

[Formulario de cálculo de bipiridilos, versión vigente.](#)

Frasco para homogeneizador de 300 mL.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 6 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPIRIDILOS EN MATRICES BIOLÓGICAS ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	

Gabacha.

Gradillas para tubos de 18 mm y de 32 mm.

Guantes de látex o nitrilo desechables.

[Hoja de cálculo biperidilos, versión vigente.](#)

[Homogeneizador de tejidos IKA Ultra Turrax T-18 o con dispersores desechables o similar.](#)

Lavadora automática de cristalería.

[Listado de tipos de caso de la Sección de Toxicología.](#)

Micropipeta de 100-1000 µL.

Micropipeta de 10-100 µL.

Micropipeta de 20-200 µL.

Papel de filtro N° 4. de 12,5 cm de diámetro.

Papel para tareas delicadas tipo "kimwipes".

Pastillas de agitación magnética.

Pinzas con diente de ratón.

Pipeta automática de 0,5 a 5 mL.

Pipeta graduada de 5 mL

Pizetas plásticas de 500 mL.

Prensa para buretas.

Probeta de vidrio de 25 mL con tapa esmerilada.

Probetas de vidrio de 5 mL, de 25 mL, de 50 mL, de 100 mL, de 500 mL, de 1 L y de 2 L.

Puntas de micropipeta de 100-1000 µL nuevas.

Puntas de micropipeta de 10-100 µL nuevas.

Puntas de micropipeta de 20-200 µL nuevas.

Puntas de pipeta automática de 0,5 a 5 mL nuevas.

Recipientes plásticos boca ancha de 150-250 mL nuevos.

[Refrigerador \(>0 a 10°C\).](#)

[Sistema Automatizado del Departamento de Ciencias Forenses \(SADCF\).](#)

Soportes de laboratorio.

Tijeras para disección.

Tina plástica

Tubos plásticos de tapa rosca de 50 mL nuevos.

Viales silanizados de vidrio ámbar de 5 mL con rosca y tapas con teflón nuevos.

Vidrio de reloj de 10 cm de diámetro.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 7 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPIRIDILOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	

Nota 1. Lave la cristalería y otro material reutilizable según el Procedimiento para el manejo general de casos en la Sección de Toxicología Forense.

## 5. Reactivos y Materiales de Referencia:

Acido tricloroacético p.a.

Agua desionizada tipo II.

Agua tipo I (ultrapura del sistema Milli-Q con resistividad mínima de 18 MΩ/cm).

Cloruro de amonio p.a.

Dilución 1 de paraquat en agua de 100 µg/mL (ver Anexo No. 1).

Dilución 2 de paraquat en agua de 500 µg/mL (ver Anexo No. 1).

Disolución de ácido clorhídrico 1 M (ver Anexo 1). 100 mL por muestra, blanco o patrón.

Disolución de ácido tricloroacético 20 % p/v (ver Anexo 1). 35 mL por muestra, blanco o patrón.

Disolución de hipoclorito de sodio al 0,5 % (Ver Anexo 1).

Disolución de cloruro de amonio 2,5 % p/v (ver Anexo 1). 100 mL por muestra, blanco o patrón

Disolución de cloruro de amonio s.s. (ver Anexo 1).

Disolución de ditionito de sodio 10 mg/mL (ver Anexo 1). 0,5 mL por blanco, muestra o patrón.

Disolución de hidróxido de sodio 1 M (ver Anexo 1).

Disolución de hipoclorito de sodio comercial del 3-12%.

Disolución intermedia de paraquat de 35 µg/mL (ver Anexo No. 1).

Ditionito de sodio (calidad p.a. o calidad bioquímica o calidad reactivo o calidad ACS, pureza mínima 82 %).

Etanol p.a. al 95%.

Hidróxido de sodio p.a.

Matriz riñón blanco (10 g de riñón de vaca en tubos plásticos de 50 mL)

Patrón de Paraquat certificado con pureza y fecha de vencimiento.

Resina de intercambio iónico Merck Amberlite® IR-120, diámetro de partícula 0,3-1,1 mm. 3 g por blanco, muestra o patrón.

Silica gel con indicador de humedad.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES				VERSIÓN 03	PAGINA: 8 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPIRIDILOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA				P-DCF-ECT-TOX-017	

## 6. Condiciones Ambientales:

No.	Condición ambiental	Valor mínimo	Valor máximo	Otras características
1	Etapa de homogenización y desnaturalización de las muestras.	No es crítico para el proceso	No es crítico para el proceso	Dentro de cámara de bioseguridad tipo I o clase II-B2.
2	Cromatografía de intercambio iónico	No es crítico para el proceso	No es crítico para el proceso	Mesa de laboratorio donde se encuentran las columnas de intercambio iónico, previamente desinfectada con papel toalla empapado con disolución de hipoclorito de sodio al 0,5%.
3	Etapa de análisis por espectrofotometría	Aire acondicionado	Aire acondicionado	No se requiere el monitoreo periódico de la temperatura.

## 7. Procedimiento:

### 7.1 Solicitud de las muestras y preparación inicial:

- 7.1.1** Utilice gabacha, guantes desechables y lentes de seguridad. Tenga mucho cuidado al manipular el ácido tricloroacético.
- 7.1.2** Para la preparación, verificación y conservación de reactivos y materiales críticos, así como de material de referencia y de disoluciones preparadas a partir de CRM refiérase al Procedimiento para el manejo general de casos en la Sección de Toxicología Forense.
- 7.1.3** Analice al mismo tiempo un máximo de 8 preparaciones entre muestras incógnitas, matriz de riñón blanco y blanco enriquecido de riñón.
- 7.1.4** Remita como perito de la Unidad de Drogas/Plaguicidas la lista de casos pendientes de análisis de bupiridilos al técnico encargado de actualizar la Base de datos "RAS electrónico plaguicidas".

Nota 2: La Base de datos "RAS electrónico plaguicidas" contiene los casos y objetos registrados en el SADCF que están pendientes de análisis. Esta base se actualiza cuando el técnico encargado recibe la solicitud de los peritos con los casos que deben ser incluidos para cada análisis específico.

- 7.1.5** Realice como técnico encargado una consulta en la Base de datos "RAS electrónico plaguicidas" de los casos pendientes de análisis por bupiridilos y seleccione la información de esos casos, para ir llenando el formulario "Lista de objetos de análisis por plaguicidas Bupiridilos"
- 7.1.6** Entregue el Formulario "Lista de objetos de análisis por plaguicidas Bupiridilos" al encargado de la bodega de indicios para que proceda a buscar las muestras y entregárselas al técnico encargado del análisis a través del SADCF. Procure en la medida de lo posible entregar dicha lista al menos 24 horas antes del análisis para dar tiempo al encargado de la bodega de buscar los indicios de interés.



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 9 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPIRIDILOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	

- 7.1.7** Utilice como perito encargado del análisis de datos, el SADCF para asignarse a todos los casos del Formulario "Lista de objetos de análisis por plaguicidas Bipiridilos" e iniciar el Registro de Análisis en Serie.
- 7.1.8** Saque del congelador dos muestras de riñón blanco de vaca.
- 7.1.9** Coloque las muestras que estén congeladas en una gradilla dentro de una tina plástica debajo del grifo. Deje que un flujo de agua fría caiga sobre la tina hasta que las muestras se temperen.
- 7.1.10** Pese en la balanza granataria 3,0 g de la resina Amberlite IR120 en un beaker de 50 mL y trasvásela a la columna de vidrio con ayuda de agua desionizada. Repita para todas las columnas que necesite.
- 7.1.11** Una vez que las columnas tengan la resina, asegúrese que tienen una marca que indica los 100 mL de volumen. Si no la tuvieran, Mida con probeta 100 mL de agua desionizada y deposítela en la columna. Haga una marca en el menisco del agua dentro de la columna.
- 7.1.12** Antes de iniciar, las columnas deben tener resina y el nivel de agua debe estar apenas por encima de esta.
- 7.1.13** Llene las pizetas de 500 mL correspondientes con ácido clorhídrico 1 M, cloruro de amonio al 2,5 % p/v y agua desionizada. Llene el frasco del dispensador de ácido tricloroacético, ajuste la marca del volumen en 30 mL y púrguelo accionándolo dos veces con la llave roja cerrada.
- 7.2 Homogenización y desnaturalización de las muestras:**
- 7.2.1** Rotule de manera ascendente, con el número de objeto y el N° de autopsia, una columna de intercambio iónico, un frasco de homogenización de 300 mL, un beaker de 150-250 mL y un tubo cónico de 50 mL, por cada muestra incógnita. Haga lo mismo para el blanco de muestra y el blanco enriquecido.
- 7.2.2** Limpie la cámara de bioseguridad según lo señalado en el PON de "Limpieza, Revisión y Control de áreas de trabajo".
- 7.2.3** Para las muestras incógnitas de riñón empleando una pinza con diente de ratón y una tijera de disección corte un pedazo de tejido y colóquelo en un vidrio de reloj. Corte en pequeños pedazos tratando de eliminar todo lo que sea tejido blanquecino.
- 7.2.4** Pese, utilizando balanza granataria, en el frasco para homogenizar correspondiente,  $10,0 \pm 0,1$  g de riñón del tejido cortado en pequeños trozos. Si va a utilizar el homogeneizador de dispersores desechables puede pesar en estos.
- 7.2.5** Lave las pinzas y las tijeras enjuagándolas en disolución de hipoclorito de sodio al 0,5 % eliminando primero todo el tejido, luego lave con jabón alcalino con esponja o cepillo, enjuague con agua de grifo, agua desionizada y etanol antes utilizarlas de nuevo. Deposite el vidrio de reloj en la tina con disolución de hipoclorito de sodio al 0,5%.
- 7.2.6** Trasvase los dos tubos con 10 gramos de riñón blanco de vaca de los tubos plásticos a los frascos de homogenización o dispersores desechables del riñón blanco y el blanco enriquecido de riñón.
- 7.2.7** Agregue, con probeta de 25 mL, 25 mL de agua desionizada a los controles y las muestras.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES				VERSIÓN 03	PAGINA: 10 de 39
DETERMINACIÓN BIPIRIDILOS ESPECTROFOTOMETRÍA	CUALITATIVA EN MATRICES	Y	CUANTITATIVA BIOLÓGICAS	DE POR	P-DCF-ECT-TOX-017

**7.2.8** Licue el blanco de riñón y el blanco enriquecido de riñón con el homogeneizador de tejidos hasta obtener una mezcla homogénea. No es necesario lavar el homogeneizador entre los blancos. Puede usar el homogeneizador para dispersores desechables a 6000 r.p.m. por 1 minuto.

**7.2.9** Si va a utilizar el homogeneizador Ultraturrax:

**7.2.9.1** Licue una muestra incógnita de riñón dentro del frasco homogeneizador hasta que no queden pedazos grandes de tejido y se observe una mezcla homogénea.

**7.2.9.2** Desarme el homogeneizador de tejidos y enjuáguelo en la tina con disolución de hipoclorito de sodio al 0,5% eliminando primero todo el tejido, luego lave con jabón alcalino con hisopo o cepillo, enjuague con agua de grifo, con agua desionizada y con etanol antes utilizarlo de nuevo. Arme de nuevo el homogeneizador y acciónelo dentro de un beaker de 50 mL con agua desionizada por 15 segundos. Deseche el agua.

**7.2.9.3** Licue por 15 segundos el blanco de muestra a pesar de que ya este homogenizado, esto para evaluar la limpieza del homogeneizador de tejidos y del proceso. Después lo puede utilizar en la siguiente muestra sin lavarlo.

**7.2.9.4** Repita los puntos 7.2.8.1 al 7.2.8.3 para las demás muestras de riñón.

Nota 3 Si utiliza el homogeneizador de dispersores desechables puede licuar las muestras a 6000 r.p.m. por 1 minuto sin necesidad de aplicar los pasos 7.2.8.1 al 7.2.8.3.

**7.2.10** Si utilizó dispersores desechables, pase todo el contenido a frascos para homogeneizador.

**7.2.11** Agregue con la micropipeta de 100-1000  $\mu$ L, 500  $\mu$ L de la disolución intermedia de Paraquat de 35  $\mu$ g/mL a los blancos enriquecidos. Agite manualmente rotando el frasco lentamente.

**7.2.12** Con el dispensador de ácido tricloroacético deposite directamente en los frascos de homogenización, 30 mL de ácido tricloroacético para cada muestra o control. Agite suavemente rotando los frascos de homogenización.

**7.2.13** Coloque un embudo de plástico de 8 cm de diámetro sobre cada uno de los recipientes plásticos o beaker de 150-250 mL rotulados al inicio. Doble y coloque un papel de filtro N°4 de 12,5 cm de diámetro en cada embudo. Deposite el homogenizado en el embudo correspondiente.

**7.2.14** Al final, cuando casi se haya detenido la filtración, agregue con probeta de 5 mL, 5 mL de ácido tricloroacético al 20 % p/v a cada frasco de homogenización a manera de enjuague, agite rotando manualmente, deposite de nuevo en el embudo que esta sobre el frasco o beaker. Espere a que la filtración se haya detenido por completo. Conserve el filtrado libre de proteínas y deseche el sólido del embudo en una bolsa plástica, ciérrela con un nudo y deséchela en el basurero de desechos biológicos.

### **7.3 Cromatografía de intercambio iónico:**

**7.3.1** Pase el filtrado libre de proteínas de las muestras y los blancos a la columna correspondiente, abra la llave de las columnas y gradúe el flujo a aprox. 1 gota por segundo. Recolecte los residuos en un beaker de 400 mL, detenga el flujo cuando el filtrado este justo por encima de la resina, no deje que esta se seque.

**7.3.2** Llene las columnas con agua desionizada hasta la marca de 100 mL, utilizando la pizeta de 500 mL, deje pasar con la llave de la columna completamente abierta, recolecte los

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES				VERSIÓN 03	PAGINA: 11 de 39
DETERMINACIÓN BIPIRIDILOS ESPECTROFOTOMETRÍA	CUALITATIVA EN MATRICES	Y	CUANTITATIVA BIOLÓGICAS	DE POR	P-DCF-ECT-TOX-017

residuos en el beaker de 400 mL. Detenga el flujo justo antes de que el menisco toque la resina, no deje que se seque. Repita el lavado de la misma manera con 100 mL de ácido clorhídrico 1 M y 100 mL de cloruro de amonio al 2,5 % p/v. Vaya descartando el desecho del beaker de 400 mL en la pila.

**7.3.3** Mida con probeta de 50 mL, 45 mL de cloruro de amonio s.s. y deposítelos en las columnas, deje pasar graduando la llave de la columna para que el goteo sea de 1 gota cada 5-7 segundos. Recolecte el extracto en un balón aforado de 50 mL. Afore con cloruro de amonio s.s. y pase de inmediato al tubo plástico de 50 mL correspondiente. Retire los tubos y tápelos.

**7.3.4** Conserve a temperatura ambiente, las lecturas en el espectrofotómetro UV/Vis pueden realizarse al día siguiente de ser necesario.

**7.3.5** Deseche en el basurero la resina, lave las columnas y colóquelas de nuevo en los soportes.

**7.3.6** Limpie la superficie de la mesa de laboratorio con papel toalla impregnada con hipoclorito de sodio al 0,5%.

#### **7.4 Análisis por espectrofotometría UV/Vis de las muestras:**

**7.4.1** Prepare la disolución de ditionito de sodio de 10 mg/mL como se indica en el Anexo 1. Vierta aprox. 20 mL de cloruro de amonio s.s. en un beaker de 50 mL, rotúlelo. Vierta el ditionito en otro beaker de 50 mL. Colóquelos al lado del espectrofotómetro.

**7.4.2** Acceda al directorio [C:/UV-VIS Varian 50 BIO/Bipiridilos/Curvas Paraquat en la computadora que controla el UV/VIS Varian Cary 50 BIO.](#)

**7.4.3** Abra el archivo "Curva de paraquat dd-mm-aa" de fecha más reciente. Automáticamente se abrirá el software "Cary Win UV" con las condiciones de la curva de paraquat vigente para riñón.

**7.4.4** Saque de la gaveta debajo del UV, las cubetas de cuarzo que están en un frasco con etanol al 95%. Enjuáguelas con agua desionizada. Déjelas escurrir invertidas sobre papel toalla.

**7.4.5** Llene la bitácora de control del espectrofotómetro UV/Vis. Antes de introducir una cubeta en el espectrofotómetro límpiela por fuera con papel para tareas delicadas tipo "kimwipes"

**7.4.6** Con micropipeta de 100-1000 µL, coloque en una cubeta 500 µL de disolución de ditionito de sodio 10 mg/mL y con pipeta automática de 0,5 a 5 mL, 2,5 mL de cloruro de amonio s.s. Coloque en el portaceldas del UV. En la pantalla principal del programa oprima en la opción "Cero" (Ver Anexo 2).

**7.4.7** En la pantalla principal del programa oprima en la opción "Preparar". Se desplegará una pantalla con varias cejillas. Presione en la cejilla "Muestras" (Ver Anexo 2). Llene la información de los blancos y muestras que va a analizar, iniciando con el (los) blanco (s) de muestra, blanco (s) enriquecido (s) y después las muestras incógnitas en orden creciente de No. de objeto y el No. de autopsia.

**7.4.8** En la pantalla principal del programa oprima en la opción "INICIAR" (Ver Anexo 2). Se despliega una pantalla con la lista de muestras que se van a analizar, oprima "OK" en esta pantalla.

**7.4.9** El software le irá indicando mediante un mensaje en la pantalla cuál muestra/control debe leer. Agregue en una cubeta de cuarzo, 500 µL de ditionito de sodio 10 mg/mL y

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 12 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPIRIDILOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	

tome con pipeta automática de 0,5 a 5 mL, 2,5 mL del blanco de matriz y déjelos en la cubeta. Coloque en el portaceldas del espectrofotómetro y presione "OK" en la pantalla con el aviso. Repita para el blanco enriquecido y luego las muestras.

**7.4.10** Anote en el formulario "Lista de objetos de análisis por plaguicidas bipiridilos" si la preparación es incolora, si se torna azul o verde en la columna "Apariencia del extracto"

**7.4.11** Realice una dilución si la absorbancia de la muestra está por encima de lo indicado en la "Hoja cálculo Bipiridilos", anote la dilución en formulario "Lista de objetos de análisis por plaguicidas bipiridilos" Esta dilución se calcula dividiendo la absorbancia obtenida entre 0,25. Esta es la absorbancia media de la curva de calibración. Deje las muestras que tenga que diluir para programarlas de nuevo en el equipo después de leer todas las muestras la primera vez.

**7.4.12** Tome en cuenta que si la absorbancia de la muestra sin diluir es mayor a 1 la relación lineal de ésta con la concentración se pierde y entonces se necesita hacer una dilución mayor a la calculada para que la absorbancia final sea la esperada.

**7.4.13** Efectúe una de las siguientes diluciones, si la dilución calculada esta entre dos de estas, utilice la más alta. Agregue los volúmenes indicados directamente en la cubeta de cuarzo.

Factor de dilución	Volumen de muestra (µL)	Volumen de cloruro de amonio s.s. (mL)	Volumen final (mL)
2	1250	1,25	2,5
3	833	2,17	2,5
5	500	2,0	2,5
10	250	2,25	2,5
15	167	2,33	2,5
20	125	2,375	2,5
30	75	2,425	2,5
50	50	2,450	2,5
100	25	2,475	2,5

**7.4.14** Para tomar volúmenes de muestra o cloruro de amonio s.s. entre 1 y 2,5 mL utilice la pipeta automática de 0,5 a 5 mL, para volúmenes entre 125 y 1000 µL utilice la micropipeta de 100 a 1000 µL, para volúmenes entre 25 y 100 µL utilice la micropipeta de 10-100 µL.

**7.4.15** Agregue con micropipeta de 100-1000 µL, 500 µL de disolución de ditionito de sodio 10 mg/mL a la dilución y continúe según se indica en 7.4.7 a 7.4.12.

**7.4.16** Guarde la información al finalizar como "Bipiridilos dd-mm-aa" en el directorio "UV-VIS Varian 50 BIO/Bipiridilos" (accediendo a "Fichero" en el menú principal del programa, opción "salvar datos como")

**7.4.17** Imprima un reporte en .pdf accediendo a "Fichero" en el menú principal del programa, opción "imprimir").

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES				VERSIÓN 03	PAGINA: 13 de 39
DETERMINACIÓN BIPIRIDILOS ESPECTROFOTOMETRÍA	CUALITATIVA EN MATRICES	Y	CUANTITATIVA BIOLÓGICAS	DE POR	P-DCF-ECT-TOX-017

**7.4.18** Enjuague todas las cubetas con agua desionizada, déjelas escurrir invertidas sobre papel toalla. Sumérlas en el alcohol donde se encontraban al inicio. Guárdelas en la gaveta.

**7.4.19** Termine de llenar la bitácora de control de equipo del espectrofotómetro UV/Vis. Complete el Registro de Análisis en Serie de Bipiridilos en el SADCF.

## **7.5 Preparación de la curva de calibración de paraquat en riñón:**

Nota 4 La linealidad del método según la validación es hasta 50 µg/g de riñón, sin embargo, la curva de calibración que se usa en la rutina es hasta 15 µg/g de riñón y las muestras que están por encima de esta concentración se diluyen según 7.4.13.

**7.5.1** Para la curva en riñón saque del congelador 7 tubos con riñón blanco de vaca. Colóquelos en gradillas dentro de una tina plástica y deje un flujo de agua fría de grifo en la tina hasta que las muestras se temperen.

**7.5.2** Utilice la hoja de cálculo H:\reporte\paraquat\curvas\CURVA PARAQUAT -RIÑÓN DDMMM\_AA.xlsx" para la curva de calibración. Salve el archivo como CURVA PARAQUAT -RIÑÓN DDMMM\_AA con la fecha que corresponda

**7.5.3** En estas hojas llene la información de las celdas con fondo gris (información del analista, la fecha, y la información de los reactivos).

**7.5.4** Antes de iniciar con la curva debe efectuar lo indicado en los puntos 7.1.10 al 7.1.13.

**7.5.5** Rotule 7 frascos de homogenización de 300 mL, 7 dispersores desechables (si va a usar el homogeneizador para estos) 7 recipientes de plástico o beakers de 125-250 mL, 7 columnas de cromatografía y 7 tubos plásticos de 50 mL de manera ascendente como patrón 1 al 6, indique y rotule un frasco como blanco de muestra.

**7.5.6** Para la curva en riñón trasvase 7 de las muestras de 10 gramos de riñón blanco de los tubos a los frascos de homogenización o dispersores desechables (si va a usar el homogeneizador para estos)

**7.5.7** Agregue, con probeta de 25 mL, 25 mL de agua desionizada a los patrones y el blanco.

**7.5.8** Para la curva en riñón licue los patrones y el blanco hasta que no queden pedazos grandes de tejido y se observe una mezcla homogénea. No es necesario lavar el homogeneizador entre patrones o el blanco. Puede utilizar el homogeneizador para dispersores desechables.

**7.5.9** Limpie el homogeneizador al final como se indica en el punto 7.2.9.

**7.5.10** Enriquezca con paraquat los patrones según el siguiente esquema, este se encuentra también en el protocolo de la curva de calibración. Utilice la micropipeta de 10-100 µL para volúmenes inferiores a 100 µL, la micropipeta de 20-200 µL para volúmenes entre 20 y 200 µL y la micropipeta de 100-1000 µL para volúmenes mayores a 200 µL.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES				VERSIÓN 03	PAGINA: 14 de 39
DETERMINACIÓN BIPIRIDILOS ESPECTROFOTOMETRÍA	CUALITATIVA EN MATRICES	Y	CUANTITATIVA BIOLÓGICAS	DE POR	P-DCF-ECT-TOX-017

DILUCIÓN	PATRÓN					
	1	2	3	4	5	6
Dilución 1 de paraquat de 100 µg/mL	100 µL	150 µL	250 µL	--	--	--
Dilución 2 de paraquat de 500 µg/mL	--	--	--	150 µL	200 µL	300 µL

- 7.5.11** Efectúe el procedimiento del punto 7.4.1 al punto 7.4.9 para todos los patrones y el blanco. Puede leer los patrones de manera ascendente (no hay necesidad de lavar la cubeta solo escúrrala).
- 7.5.12** En la pantalla principal del programa oprima en la opción "Preparar". Se desplegará una pantalla con varias cejillas. Presione en la cejilla "Patrones". Llene la información con la concentración de los patrones según lo indicado en 7.5.10 de concentración menor a mayor. Marque la opción "Calibrar durante análisis." (Ver Anexo No. 2). El equipo ya tiene definido que se trata de un análisis por duplicado, solo es necesario ingresar la información una vez por patrón.
- 7.5.13** Presione en la cejilla "Muestras". Llene la información para el blanco de muestra.
- 7.5.14** En la pantalla principal del programa oprima en la opción "INICIAR" (Ver Anexo No. 2). Se despliega una pantalla con la lista de patrones/blanco que se van a analizar, oprima "OK" en esta pantalla.
- 7.5.15** El software le irá indicando mediante un mensaje en la pantalla cuál patrón/blanco debe leer. Llene una cubeta con la réplica del patrón correspondiente, coloque en el espectrofotómetro y presione "OK" en la pantalla con el aviso. Realice la lectura de todos los patrones/blanco. Utilice la misma cubeta para todos los patrones en orden ascendente de concentración.
- 7.5.16** Guarde al final la información como "Curva de Paraquat en riñón dd-mm-aa" en el directorio "UV-VIS Varian 50 BIO/Bipiridilos/Curvas Paraquat" (accediendo a "Fichero" en el menú principal del programa, opción "salvar datos como")
- 7.5.17** Imprima un reporte accediendo a "Fichero" en el menú principal del programa, opción "imprimir").
- 7.5.18** Enjuague todas las cubetas con agua desionizada, déjelas escurrir invertidas sobre papel toalla. Sumérlas en el alcohol donde se encontraban al inicio. Guárdelas en la gaveta.
- 7.5.19** Llene la información necesaria en la bitácora de control del equipo (espectrofotómetro UV/Vis).
- 7.5.20** Abra con el programa Microsoft Excel el protocolo de la curva. Ingrese los datos de las celdas en gris al archivo. La curva se calcula automáticamente. Pase al punto 8.1 y evalúe la curva según esos criterios. Si la curva los cumple continúe y si no refiérase a la columna de "Corrección Aplicable" en dicho punto.
- 7.5.21** Salve con la fecha actual la "Hoja cálculo bipiridilos DDMMM\_AA y actualice los datos de intercepto, pendiente, el r2, la fecha, el archivo y el analista por los datos de la nueva curva. Sustituya también el "Valor de reporte A min." por la absorbancia promedio del

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 15 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPIRIDILOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	

patrón más bajo de la curva y el "Valor de reporte A max" por la absorbancia promedio del patrón más alto de la curva nueva.

Nota 5 La curva de calibración debe realizarse como mínimo cada dos años o cuando no se cumplan los criterios establecidos en el punto 8.

## 8. Criterios de Aceptación o Rechazo de Resultados:

### 8.1 Curva de Calibración

No.	Criterio de Aceptación	Valor Límite	Corrección Aplicable
1	Coeficiente de correlación "r" de la curva de calibración.	$\geq 0,99$	Si el coeficiente de correlación de la curva de paraquat de riñón es menor a 0,99 prepare de nuevo la disolución de ditionito de sodio y lea todos los patrones de nuevo, si esto no resuelve el problema, revise las diferencias en absorbancia entre las réplicas, si para algún punto de la curva hay una diferencia mayor a un %RSD de 20%, repita las dos réplicas de ese punto. Si el problema se presenta de nuevo, puede intentar eliminar de la curva el punto que está más desviado de la recta de mejor ajuste, siempre y cuando no se trate del patrón 1 ni del patrón 6. Si la linealidad aun así no mejora deberá repetirse la curva.
2	Debe cumplirse el criterio estadístico de "Fisher" para el ajuste de mínimos cuadrados.	N/A	Si el coeficiente de correlación de la curva de paraquat de riñón no cumple el criterio de "Fisher" para el ajuste lineal, prepare de nuevo la disolución de ditionito de sodio y lea todos los patrones de nuevo, si esto no resuelve el problema, revise las diferencias en absorbancia entre las réplicas, si para algún punto de la curva hay una diferencia mayor a un %RSD de 20 %, repita las dos réplicas de ese punto. Si el problema se presenta de nuevo, puede intentar eliminar de la curva el punto que está más desviado de la recta de mejor ajuste, siempre y cuando no se trate del patrón 1 ni del patrón 6. Si la linealidad aun así no mejora deberá repetirse la curva.



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES				VERSIÓN 03	PAGINA: 16 de 39
DETERMINACIÓN BIPIRIDILOS ESPECTROFOTOMETRÍA	CUALITATIVA EN MATRICES	Y	CUANTITATIVA BIOLÓGICAS	DE POR	P-DCF-ECT-TOX-017

## 8.2 Resultado positivo cuantitativo

No.	Criterio de Aceptación	Valor Límite	Corrección Aplicable
1	Absorbancia del blanco de muestra.	0,014 unidades de absorbancia	Si en cualquiera de los casos el blanco de muestra presenta una absorbancia a 396 nm mayor a 0,014 deberá repetirse el análisis de todas las muestras incógnitas de esa matriz.
2	Concentración calculada para paraquat en la muestra.	>1 µg/g de riñón.	Si la concentración detectada es menor a 1 µg/g de riñón y mayor a 0,3 µg/g de riñón el resultado positivo solo se podrá reportar cualitativo.
3	Concentración calculada para paraquat en el blanco enriquecido. Para graficar el dato abra el archivo en H:\reporte\Paraquat\Gráficos control\Gráfico Control.xls. Ingrese la fecha, la absorbancia del blanco de muestra y la del blanco enriquecido. Revise en el gráfico el punto que acaba de ingresar	1,75 µg/g de riñón ± 2* %RSD histórico en el gráfico de control de paraquat en riñón.	Si el resultado para el blanco enriquecido se sale de 1,75 µg/g de riñón ± 2 desviaciones estándar, prepare de nuevo la disolución de ditionito de sodio y pruebe de nuevo, si no se soluciona el problema, el análisis de las muestras debe repetirse. Si el blanco enriquecido de riñón se sale de control 3 veces seguidas, o si se agotó el patrón de paraquat y debe utilizarse otro para preparar una nueva disolución madre; la curva debe realizarse a pesar de que no haya pasado un año desde la curva anterior.
4	Que el blanco de matriz no desarrolle ningún color al agregarle la disolución de ditionito.	Blanco de matriz incoloro	Si el blanco de matriz presenta una coloración deberá repetirse el análisis de todas las muestras incógnitas.

## 9. Cálculos y evaluación de la incertidumbre:

**9.1** Para el reporte de las muestras de riñón positivas cuantitativas por paraquat, calcule la concentración de paraquat y su incertidumbre utilizando la hoja de cálculo denominada "Hoja cálculo Bipiridilos" que se encuentra en el servidor "Toxicología-Documents" con la siguiente dirección: H:\reporte\Paraquat\Hoja cálculo bipiridilos ddMMM\_aa.xls. Emplee la hoja de cálculo más reciente (ver Anexo 3).

**9.2** Salve este archivo con la fecha del análisis en: H:\reporte\Paraquat\20XX.

**9.3** Complete la información en el "Formulario de análisis en serie de bipiridilos". En el "Formulario de cálculo de bipiridilos escoja el resultado entre: NSD, paraquat o diquat en la casilla "Resultado".



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 17 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPIRIDILOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	

**9.4** Para las muestras de riñón la concentración de la muestra se calcula automáticamente con la siguiente fórmula:

$$C_{PQ} = \frac{((A_m - A_b) \times F) - b}{m} \times \frac{M_t}{M_m}$$

Donde:

$C_{PQ}$  = Concentración de paraquat en mg/100 gramos de riñón.

$A_m$  = Absorbancia de la muestra

$A_b$  = Absorbancia del blanco de muestra

$F$  = Factor de dilución empleado para la lectura

$b$  = Intercepto de la curva de calibración para paraquat en riñón

$m$  = Pendiente de la curva de calibración para paraquat en riñón

$M_t$  = Cantidad de muestra empleada en la curva de calibración en g, normalmente 10 g.

$M_m$  = Cantidad de muestra empleada en el análisis.

9.5 Una vez aprobado el RAS se reporta en cada caso las hojas de cálculo que se generan para cada uno.

## 10. Reporte de Análisis y Resultados:

**10.1** Un resultado positivo por paraquat en riñón permite afirmar que: "En el organismo del (a) occiso (a) se detectó un plaguicida tóxico denominado paraquat. Cuando este se encuentra en el organismo humano, dependiendo de la cantidad de la sustancia y de las características del individuo, puede producir diversas alteraciones e inclusive la muerte".

**10.2** Además, cuando la concentración de paraquat en riñón supera los 14 µg/g de riñón se puede afirmar: "La concentración detectada en este caso se encuentra dentro del rango de concentraciones reportadas en la literatura para casos de intoxicaciones fatales con paraquat".

**10.3** Un resultado negativo permite afirmar: No se detectaron bupiridilos (paraquat ni diquat).

**10.4** Los resultados de cada caso deben incorporarse en el legajo digital correspondiente. Adjuntando también el resultado del blanco de muestra, del blanco enriquecido, del blanco de lectura anterior a la muestra y de la muestra incógnita. Si la muestra resultó positiva debe adjuntarse el resultado de la dilución y el reporte cuantitativo de paraquat.

**10.5** Incorpore, a través de un proceso de análisis en serie, en el legajo digital de cada caso los reportes generados en el punto anterior.

**10.6** Reporte los resultados en el SADCF y en el Dictamen Criminalístico.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 18 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPIRIDILOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	

**10.7** Reporte los resultados de cualitativos de bupiridilos o los resultados de paraquat cuantitativos y su incertidumbre asociada como lo indica el apartado "Reporte de resultados del PON Manejo General de Casos en la Sección de Toxicología Forense.

### **11. Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional:**

- 11.1** Utilice siempre gabacha, anteojos de seguridad y guantes desechables al manipular las muestras.
- 11.2** Siempre que salga del área de laboratorios, deseche los guantes, lavase las manos y deje la gabacha en la entrada de este.
- 11.3** Si ocurre un derrame de disolvente recójalo empapando papel toalla y colocándola en la capilla de extracción de gases.
- 11.4** Si ocurre un accidente donde se presuma contacto con material bioinfeccioso refiérase al Manual de Seguridad y Salud Ocupacional del Departamento de Ciencias Forenses.
- 11.5** Si ocurre contacto de algún reactivo con los ojos, acuda inmediatamente a la ducha para ojos que se encuentra en el laboratorio.
- 11.6** Si ocurre un derrame de algún reactivo o material biológico, refiérase al Manual de Seguridad y Salud Ocupacional del Departamento de Ciencias Forenses.

### **12. Simbología:**

aprox.: aproximadamente.

DCF: Departamento de Ciencias Forenses.

ddmm\_aa: formato de fecha día-mes\_año (por ejemplo 05dic\_07).

gr: gravedad.

LD50: dosis letal 50 %.

LD: límite de detección.

LC: límite de cuantificación.

N/A: no aplica.

p.a: calidad para análisis, calidad reactivo o calidad ACS.

PDF: Formato de documento portátil

PON: Procedimiento de Operación Normado.

PQ: paraquat.

% p/v: porcentaje peso en volumen.

r.p.m.: revoluciones por minuto.

% RSD: porcentaje de error relativo estándar.

s.s.: disolución saturada.

SCD: Solicitud Cambio Documental.

SGC: Sistema de Gestión de Calidad.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 19 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPIRIDILOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	

UGC: Unidad de Gestión de Calidad.

UV: ultravioleta.

Vis: visible.

### 13. Terminología:

Analito: Sustancia o componente que se desea determinar.

Blanco de lectura: Blanco preparado en una cubeta de cuarzo, contiene 0,5 mL de ditionito de sodio 10 mg/mL y 2,5 mL de cloruro de amonio s.s. Se utiliza como cubeta de referencia y para ajustar el cero en el espectrofotómetro antes de la lectura de una muestra, blanco o patrón.

Blanco de riñón: contiene además de la matriz blanco, todos los reactivos utilizados en la preparación y análisis de las muestras.

Blanco enriquecido de riñón: corresponde a un control preparado utilizando matriz blanco y enriquecido con los analitos, al que se aplican todos los procesos de una muestra incógnita o real.

Muestra incógnita o real: Muestra de riñón que se desea analizar por bupiridilos.

### 14. Anexos

No. de Anexo	Nombre del Anexo
1	Preparación de reactivos
2	Pantallas del programa Cary Win UV
3	<a href="#">Formulario de análisis en serie de bupiridilos</a>
4	<a href="#">Ejemplo de estimación de incertidumbre en la determinación de paraquat en riñón</a>

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 20 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPIRIDILOS EN MATRICES BIOLÓGICAS ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	

## Anexo 1 Preparación de reactivos

### Disolución de hipoclorito de sodio al 0,5 %.

Verifique en la etiqueta de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente la concentración de esta.

Determine el volumen que necesita de la disolución de cloro concentrada para preparar el volumen requerido de la disolución de hipoclorito al 0,5 %, utilizando la siguiente formula:

$$(Cd) \times (Vd) = (Cc) \times (V)$$

despejando se obtiene:  $(V) = (Cd) \times (V d) / (Cc)$ , donde:

(Cd): Concentración deseada, 0,5%.

(Vd): Volumen requerido de la disolución de la concentración deseada a preparar.

(Cc): Concentración conocida de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente.

(V): Volumen en mililitros de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente.

Utilizando una probeta adecuada al volumen a medir, adicione el volumen de la disolución de cloro concentrada adquirida comercialmente (V) al recipiente que va a contener la disolución de hipoclorito al 0,5% (ejemplo: el recipiente puede ser una pizeta de 500mL, Vd= 500 mL ).

Utilizando una probeta adecuada al volumen a medir, adicione el volumen de agua desionizada necesario para completar el volumen de la disolución de hipoclorito al 0,5% deseado.

Agite suavemente por inversión manual. Identifique el recipiente que va a contener la disolución preparada como "Disolución de hipoclorito al 0,5 %" y rotule con la fecha de preparación e iniciales de quién la prepara.

Almacene a temperatura ambiente. Esta disolución es estable al menos por 3 meses.

### Disolución de ácido clorhídrico 1 M.

En una probeta de 2 L mida 2000 mL de agua desionizada, viértalos en un erlenmeyer de 4 L. En una probeta de 500 mL mida 200 mL de ácido clorhídrico concentrado p.a. Agregue lentamente el ácido al agua. Utilice la capilla de extracción de gases para preparar esta disolución.

Cuando la disolución esté a temperatura ambiente trasvásela a una botella de vidrio de 2,5 L color ámbar. Coloque la etiqueta diseñada para reactivos preparados y llene la información requerida. Este reactivo puede conservarse hasta por un año a temperatura ambiente.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 21 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPIRIDILOS EN MATRICES BIOLÓGICAS ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	

#### **Disolución de Hidróxido de sodio 1 M.**

En un beaker de 1 L, pese utilizando balanza granataria 40,0 g de hidróxido de sodio p.a. Mida en una probeta de 1 L, 1000 mL de agua desionizada. Vierta el agua en el beaker.

Coloque en el agitador magnético, agregue una pastilla magnética y agite hasta disolver. Trasvase a una botella de plástico de 1 L. Coloque la etiqueta diseñada para reactivos preparados y llene la información requerida.

Este reactivo puede conservarse hasta por un año a temperatura ambiente.

#### **Disolución de Cloruro de amonio 2.5 % p/v.**

En un beaker de 1 L, pese utilizando balanza granataria 25,0 g de cloruro de amonio p.a. Mida en una probeta de 1 L, 1000 mL de agua desionizada. Vierta el agua en el beaker.

Coloque en el agitador magnético, agregue una pastilla magnética y agite hasta disolver. Trasvase a dos botellas de vidrio ámbar de 500 mL. Coloque la etiqueta diseñada para reactivos preparados y llene la información requerida.

Este reactivo puede conservarse hasta por un año a temperatura ambiente.

#### **Disolución de Cloruro de amonio s.s.**

En un beaker de 1 L, utilizando balanza granataria, pese 270,0 g de cloruro de amonio p.a. Mida en una probeta de 1 L 1000 mL de agua desionizada. Vierta el agua en el beaker.

Coloque en el agitador magnético, agregue una pastilla magnética y agite hasta disolver. Trasvase a dos botellas de vidrio ámbar de 500 mL. Coloque la etiqueta diseñada para reactivos preparados y llene la información requerida.

Este reactivo puede conservarse hasta por un año a temperatura ambiente.

#### **Disolución de ditionito de sodio 10 mg/mL.**

En una probeta de 25 mL con tapa esmerilada, utilizando balanza analítica pese alrededor de 0,1 g de ditionito de sodio.

Agregue hidróxido de sodio 1 M hasta llegar a un volumen necesario para llegar a una concentración de 10 mg/mL. (por ejemplo, si se pesaron 0,115 g se debe llevar el volumen 11,5 mL). Tape y agite manualmente por inversión. Rotule como "Ditionito de sodio", indique fecha y hora de preparación e iniciales.

Este reactivo se debe utilizar máximo 1,5 horas después de preparado, conservar a temperatura ambiente.

#### **Disolución de Ácido tricloroacético 20 % p/v.**

En una probeta de 1 L, utilizando balanza granataria, pesar 200,0 g de ácido tricloroacético p.a. Agregue agua desionizada hasta aprox. 600 mL, coloque en el agitador magnético, agregue una pastilla magnética y agite hasta disolver.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 22 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPIRIDILOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	

Detenga la agitación y lleve a 1000 mL con agua desionizada. Trasvase a dos botellas de vidrio ámbar de 500 mL. Coloque la etiqueta diseñada para reactivos preparados y llene la información requerida.

Este reactivo puede conservarse hasta por un año a temperatura ambiente.

### Disolución madre de paraquat.

Saque del desecador el patrón de paraquat que va a utilizar. Pese el frasco en la balanza analítica antes de utilizarlo y anote el peso en el Formulario "Registro de uso y control de material de referencia"

Pese, en la balanza analítica, entre 0,01 y 0,02 g de la sustancia en un beaker de 10 mL. Tape el beaker con papel aluminio y coloque en la estufa a 110° C por tres horas.

Deje enfriar el beaker colocándolo en el desecador. Pese, en la balanza analítica, entre 0,01 y 0,02 g del sólido del beaker en un balón aforado de 5 mL calibrado.

Llene el Formulario "Registro de uso y preparación de disoluciones madre individuales" con toda la información solicitada.

Calcule la concentración de la madre utilizando la siguiente fórmula:

$$Cn_{madre} = \frac{M_{MR} \times \frac{P_{MR}}{100} \times \frac{PM_{PQ}}{PM_{MR}}}{V_f} \times 10^6$$

Donde:

$Cn_{madre}$  = Concentración de la disolución madre en µg/mL.

$M_{MR}$  = Masa del material de referencia en g.

$P_{MR}$  = Porcentaje de pureza del material de referencia .

$PM_{PQ}$  = Peso molecular del paraquat (257,16 g/mol).

$PM_{MR}$  = Peso molecular del material de referencia en g/mol. (4 x H<sub>2</sub>O = 329,22)

$V_f$  = Volumen final de la disolución en mL.

Afore el balón con agua tipo 1. Trasvase a viales plásticos de 2 mL con tapa con teflón. Rotule como "Paraquat, madre" indique el disolvente, la fecha de preparación, las iniciales y A, B, C.. a los diferentes viales.

En el Formulario "Registro de uso y preparación de disoluciones madre individuales", asígnele un código (código del material de referencia más -M y el número que refleja la fecha de preparación) rotule el vial con este código. Pese el vial y anote el peso en el formulario.

Conserve en congelación hasta por un año.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 23 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPYRIDILOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	

### Disolución intermedia de paraquat de 35 µg/mL:

Saque del congelador la disolución madre de paraquat que va a utilizar. Llévela a temperatura ambiente. Pese el vial en la balanza analítica y anote el peso en el Formulario "Registro de uso y preparación de disoluciones madre individuales".

Utilizando la siguiente fórmula calcule el volumen de disolución madre de paraquat necesaria para preparar esta disolución:

$$V_{madre}(\mu l) = \frac{5ml \times 35\mu g / ml}{Cn_{madre}(\mu g / ml)} \times 1000$$

Tome el volumen de disolución madre calculado con micropipeta de 10-100 µL (calibrada), y deposítelo en un balón aforado de 5 mL (calibrado). Afore con agua tipo I. Traslávese a un tubo plástico de 5 mL. Rotule como "Paraquat, intermedia, 35 µg/mL, agua", indique la fecha y las iniciales.

Conserve en congelación hasta 6 meses después de preparada.

### Dilución 1 de paraquat en agua de 100 µg/mL (Curva calibración)

Saque del congelador la disolución madre de paraquat que va a utilizar. Llévela a temperatura ambiente. Pese el vial en la balanza analítica y anote el peso en el Formulario "Registro de uso y preparación de disoluciones madre individuales".

Utilizando la siguiente fórmula calcule el volumen de disolución madre de paraquat necesaria para preparar esta disolución:

$$V_{madre}(\mu l) = \frac{5ml \times 100\mu g / ml}{Cn_{madre}(\mu g / ml)} \times 1000$$

Tome el volumen de disolución madre calculado con micropipeta de 100-1000 µL (calibrada), y deposítelo en un balón aforado de 5 mL (calibrado). Afore con agua tipo I. Traslávese a un tubo plástico de 5 mL. Rotule como "Paraquat, dilución 1, 100 µg/mL, agua", indique la fecha y las iniciales.

Debe prepararse antes de realizar la curva de calibración y después de preparada debe descartarse. Conserve en congelación.

### Dilución 2 de paraquat en agua de 500 µg/mL (Curva calibración):

Saque del congelador la disolución madre de paraquat que va a utilizar. Llévela a temperatura ambiente. Pese el vial en la balanza analítica y anote el peso en el formulario "Registro de uso y preparación de disoluciones madre individuales".

Utilizando la siguiente fórmula calcule el volumen de disolución madre de paraquat necesaria para preparar esta disolución:

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 24 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPIRIDIOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	

$$V_{madre}(\mu l) = \frac{5ml \times 500\mu g / ml}{Cn_{madre}(\mu g / ml)} \times 1000$$

Tome el volumen de disolución madre calculado con micropipeta de 10-100  $\mu$ L (calibrada), y deposítelo en un balón aforado de 5 mL (calibrado). Afore con agua tipo I. Trásvase a un tubo plástico de 5 mL. Rotule como "Diquat, intermedia, 70  $\mu$ g/mL, agua", indique la fecha y las iniciales.

Conserve en congelación hasta 6 meses después de preparada.

COPIA NO CONTROLADA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 25 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPIRIDILOS EN MATRICES BIOLÓGICAS ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	

## Anexo 2

### Pantallas del programa "Cary Win UV"

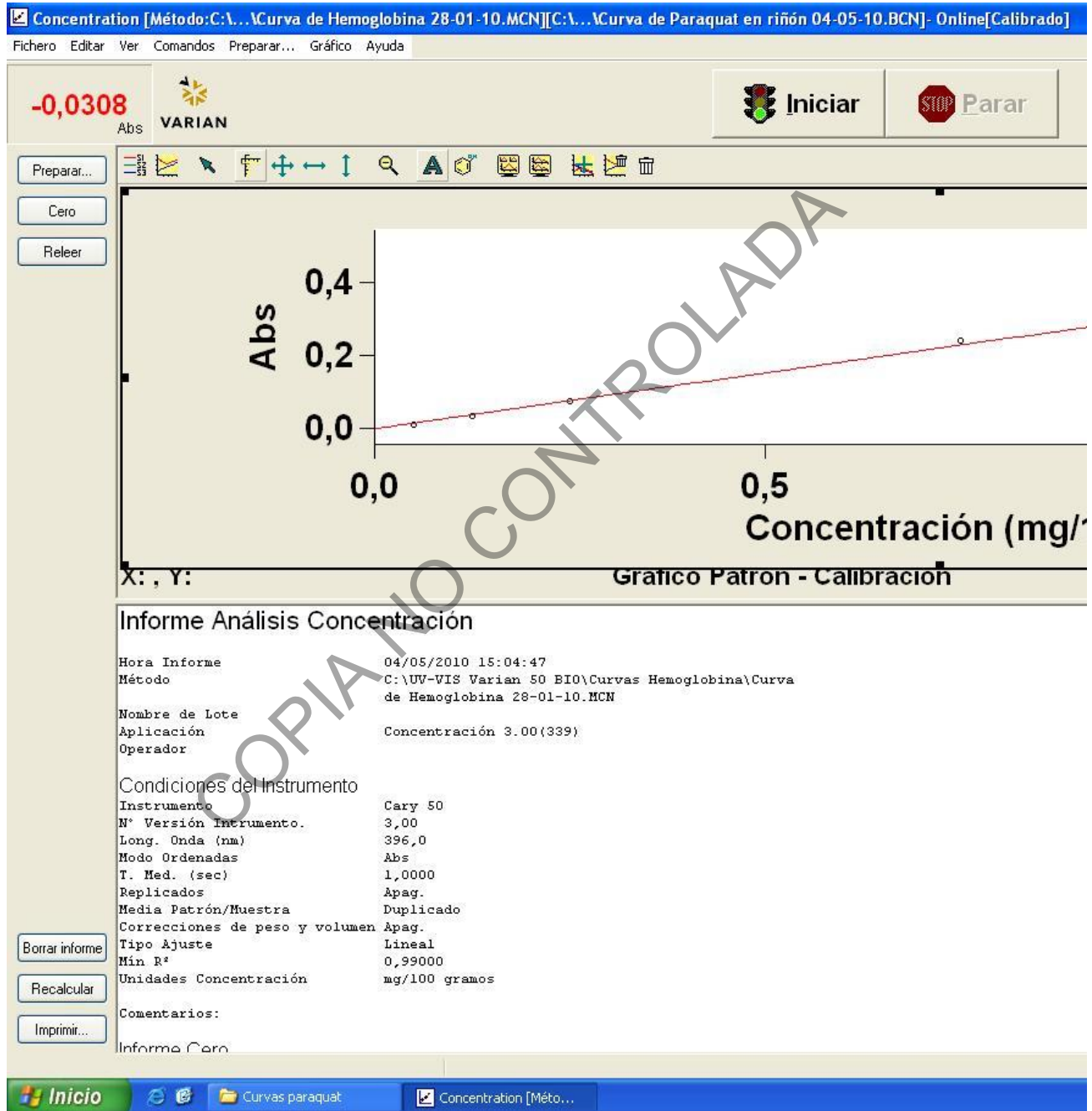
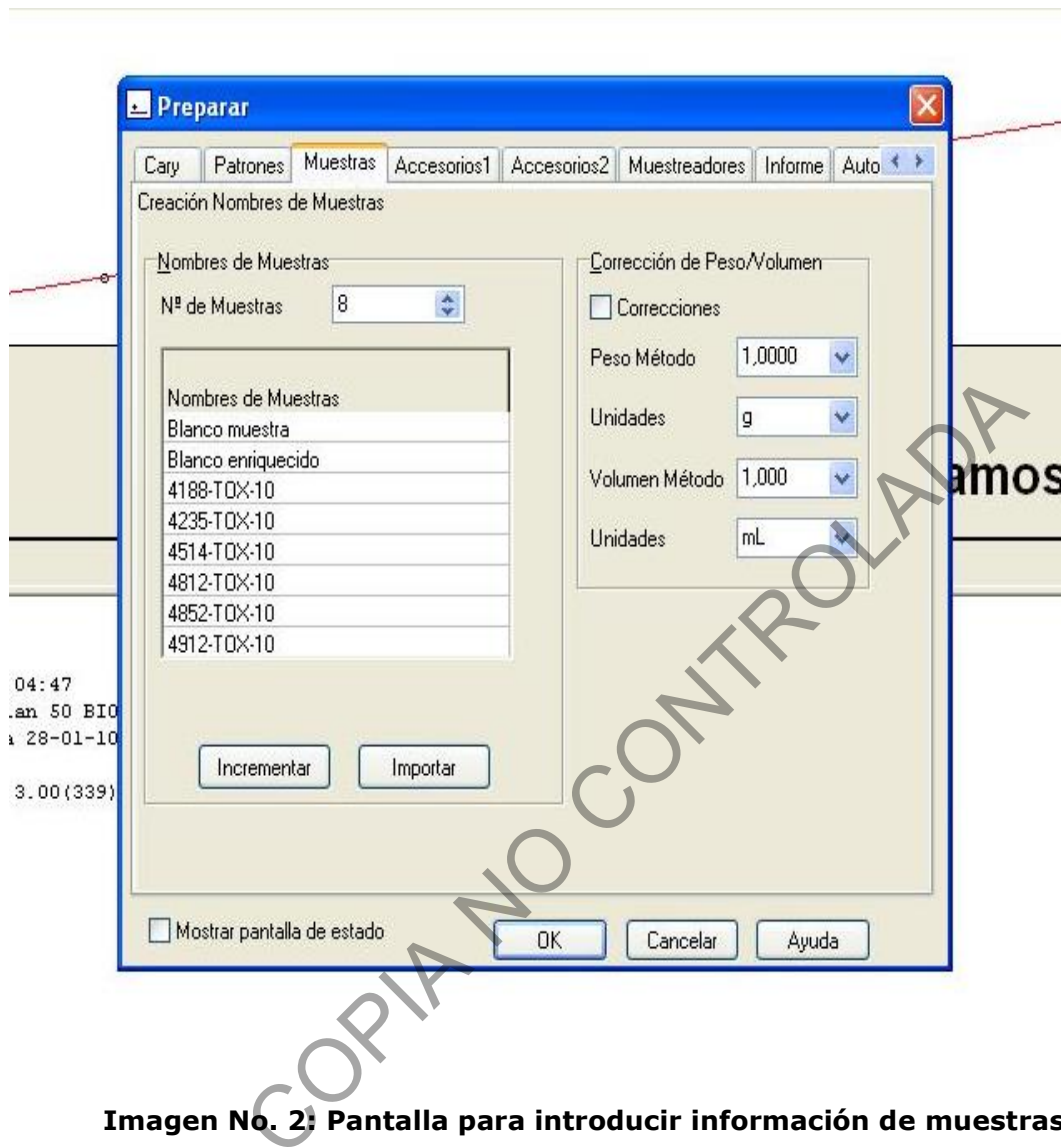
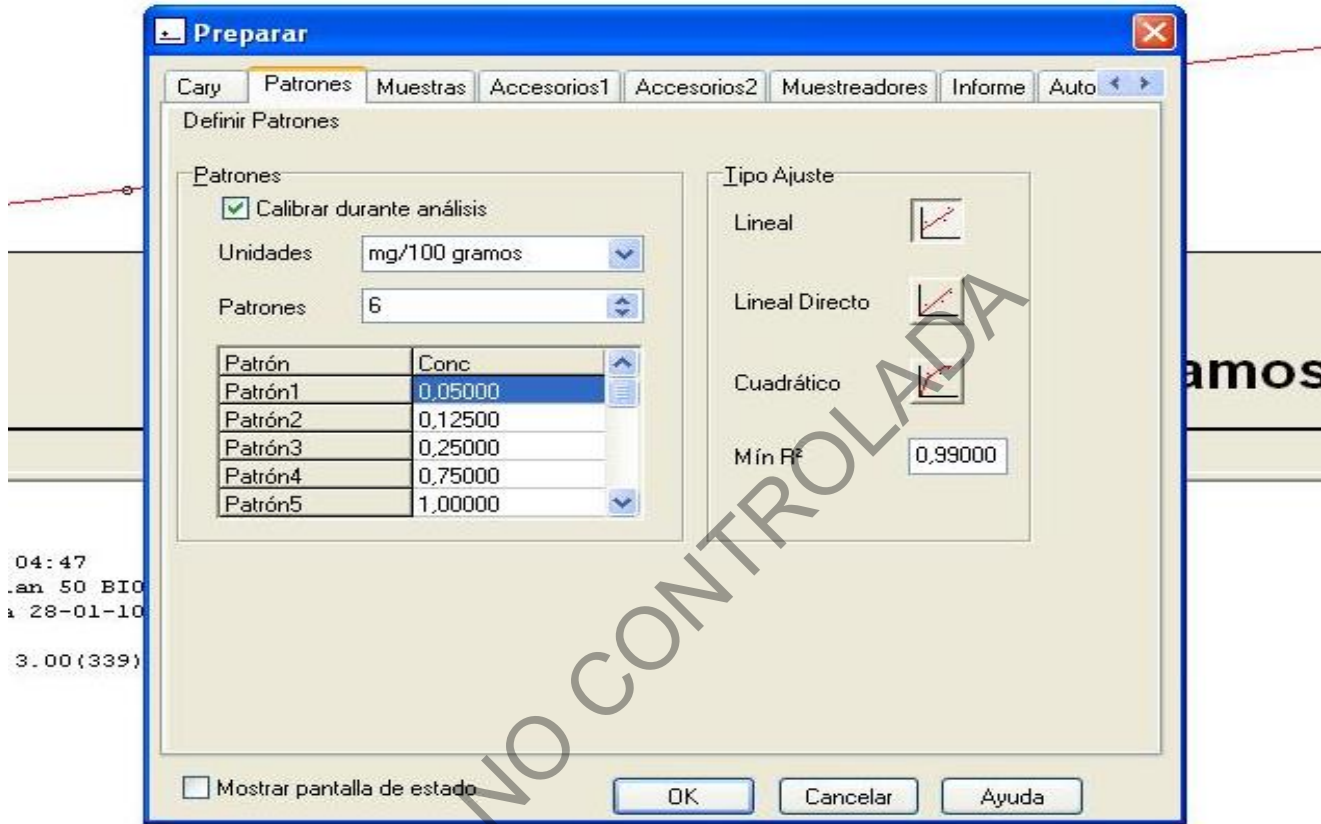


Imagen No. 1: Pantalla principal

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 26 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPIRIDILOS EN MATRICES BIOLÓGICAS ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	




**Imagen No. 2: Pantalla para introducir información de muestras**



**Imagen No. 3** Pantalla para introducir información de patrones para realizar curva de paraquat.

### Anexo 3

#### Formulario de análisis en serie de bipiridilos.

	Organismo de Investigación Judicial Departamento de Laboratorios de Ciencias Forenses Sección de Toxicología	FORMULARIO DE ANÁLISIS EN SERIE DE BIPIRIDILOS								
Fecha:		PON: P-DCF-ECT-TOX-17								
Analista:										
Perito responsable:										
<b>1. MUESTRAS</b>										
No.	DCF/ Nombre o Autopsia	Nueva columna	Tipo muestra	Cantidad de muestra	Coloración	Absorbancia a 396 nm	Dilución	Absorb. Dilución a 396 nm	No. Tubo	Observaciones
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
<b>OBSERVACIONES:</b>										
<b>2. CONTROLES</b>										
Control	Nueva columna	Resultado (absorbancia)								
Blanco muestra										
Blanco enriquecido										
<b>3. REACTIVOS PRIMER USO</b>										
Reactivo	Nuevo reactivo	Marca	Calidad	Lote						
Ácido clorhídrico										
Ácido tricloroacético										
Cloruro de amonio										
Ditionito de sodio										
Hidróxido de sodio										
Resina Amberlite										
<b>4. PREPARACIÓN DE REACTIVOS</b>					<b>5. ADJUNTOS</b>					
Disoluciones	Nueva disolución	Preparado por	Fecha	Tipo adjunto	Cantidad					
Ácido clorhídrico 1M										
Ácido clorhídrico 2M										
Ácido tricloroacético 20% p/v										
Cloruro de amonio s.s										
Cloruro de amonio 2.5% p/v										
Hidróxido de sodio 1 M										
<b>6. MATERIAL DE REFERENCIA</b>										
Material de referencia	Código	Fecha	Preparado por							
Paraquat madre										
Paraquat intermedia										
<b>Firma analista:</b>										
<b>Firma perito encargado</b>										

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES					VERSIÓN 03	PAGINA: 29 de 39
DETERMINACIÓN BIPIRIDILOS ESPECTROFOTOMETRÍA	CUALITATIVA EN MATRICES	Y	CUANTITATIVA BIOLÓGICAS	DE POR	P-DCF-ECT-TOX-017	

#### Anexo 4

### Ejemplo de estimación de incertidumbre en la determinación paraquat en riñón

#### Antecedentes:

-Este análisis se utiliza para la determinación cuantitativa de paraquat en riñón realizado en la Sección de Toxicología, se lleva a cabo por medio cromatografía de intercambio iónico y espectrofotometría ultravioleta-visible.

-Las muestras se someten a un proceso de homogenización (con el homogeneizador de tejidos) y desnaturalización (con ácido tricloroacético): se utilizan  $10,0 \pm 0,1$  gramos de muestra de riñón (pesados con balanza granataria calibrada y verificada).

-Las muestras homogenizadas y desnaturalizadas se filtran para eliminar proteínas.

-El filtrado libre de proteínas se pasa por una columna de cromatografía de intercambio iónico. El eluido se recolecta y afora a 50 mL en un balón aforado.

-Del eluido se toma una alícuota de 2,5 mL y se mezcla con 0,5 mL de la disolución de ditionito de sodio 10 mg/mL (ambos volúmenes se miden con una micropipeta calibrada y verificada). Esta mezcla se realiza para generar el compuesto que posteriormente se mide su absorbancia a 396 nm por medio de espectrofotometría ultravioleta-visible.

-La cuantificación se realiza en un ámbito de 1 a 15 ug/g, por medio de una curva de calibración utilizando 6 niveles de calibración preparados en riñón a partir de un material de referencia certificado.

-Los equipos de medición utilizados tienen trazabilidad demostrada por medio de los certificados de calibración de cada equipo.

-La determinación se controla por medio de un control en una concentración de 1,75 ug/g, preparado en riñón a partir de un material de referencia certificado.

Ejemplo de datos de una curva de calibración de la metodología:

Nivel	Variable independiente ( $\mu\text{g/g}$ )					Variable dependiente					
	$n(x_i)$	$x_i$	$U(x_i)$	$u(x_i)$	$u(x_i)\%$	$n(y_i)$	$y_i$	$s(y_i)$	$CV\%(y_i)$	$u(y_i)$	$u(y_i)\%$
1	1	1,000	0,042	0,021	2,10	2	0,02115	0,00021	1,00	0,00015	0,71
2	1	1,500	0,063	0,032	2,10	2	0,03495	0,00078	2,23	0,00055	1,57
3	1	2,50	0,11	0,053	2,10	2	0,05765	0,00021	0,37	0,00015	0,26
4	1	7,50	0,32	0,16	2,10	2	0,15625	0,00035	0,23	0,00025	0,16
5	1	10,00	0,42	0,21	2,10	2	0,21130	0,00085	0,40	0,00060	0,28
6	1	15,00	0,63	0,32	2,10	2	0,32650	0,00099	0,30	0,00070	0,21
			K=2; 95%								

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 30 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPYRIDILOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	

Parámetros del ejemplo de una curva de calibración de la metodología:

Datos del ajuste	
Parámetro	valor
Intercepto (b)	0,0020
Pendiente (m)	0,02108
Coefficiente de correlación (r)	0,9989
Desviación del intercepto $s_{(b)}$	0,0021
Desviación de la pendiente $s_{(m)}$	0,00050

-Ejemplo de los valores del resultado del análisis de una muestra utilizada como ejemplo para la estimación de su incertidumbre son los siguientes:

Datos de muestra	
$A_m$	0,0419
$A_b$	0,0039
$F$	1
$M_r$	10 g
$M_m$	10,0 ± 0,1 g

### Proceso de estimación de incertidumbre:

1. Definición de mensurando: Concentración de paraquat en riñón (ug/g), en muestras de riñón recolectada en tubos de capacidad variable. La concentración de paraquat es obtenida por la interpolación en la curva de calibración, del valor de absorbancia resultado de la resta de la absorbancia de la muestra de riñón menos la absorbancia del blanco de riñón ambas absorbancias medidas a 396 nm. Las mediciones de absorbancia se realizan utilizando el equipo Espectrofotómetro ultravioleta visible (UV-VIS) Varian Cary 50 BIO, para cubeta de 1 cm de paso de luz de sistema óptico de doble haz interno.

2. La función de medición es:

$$C_m = C_{ob} \cdot F_{mt}$$

Donde:

$C_{ob} = C_{PQ}$  = concentración de analito (ug/g), obtenido a partir de la interpolación en la curva

$C_m$  = concentración de analito en la muestra de riñón en ug/g

$F_{mt}$  = factor por la variación total del método con valor de 1.

La función medición de  $C_{ob}$  o  $C_{PQ}$  es:

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES				VERSIÓN 03	PAGINA: 31 de 39
DETERMINACIÓN DE BIPIRIDIOS ESPECTROFOTOMETRÍA	CUALITATIVA EN MATRICES	Y	CUANTITATIVA BIOLÓGICAS	DE POR	P-DCF-ECT-TOX-017

$$C_{PQ} = \frac{((A_m - A_b) \times F) - b}{m} \times \frac{M_t}{M_m}$$

Donde:

$C_{PQ}$  = Concentración de paraquat en ug/g de riñón.

$A_m$  = Absorbancia de la muestra

$A_b$  = Absorbancia del blanco de muestra

$F$  = Factor de dilución empleado para la lectura

$b$  = Intercepto de la curva de calibración para paraquat en riñón

$m$  = Pendiente de la curva de calibración para paraquat en riñón

$M_t$  = Cantidad de muestra empleada en la curva de calibración en g normalmente 10 g.

$M_m$  = Cantidad de muestra empleada en el análisis.

La concentración de analito es interpolada de una curva de calibración de la forma  $Y = mx + b$  que relaciona la diferencia de Absorbancias de la muestra y el blanco (variable dependiente) con la concentración del analito (variable independiente).

3. Lista de fuentes de incertidumbre:

a- El análisis presenta una fuente de incertidumbre aleatoria asociada a la reproducibilidad de la medición, cuantificada por el coeficiente de variación porcentual del control positivo preparado en riñón de 1,75 ug/g. Dentro de esta fuente se incluye la influencia de diferentes preparaciones de reactivos, diferentes analistas, diferentes condiciones ambientales, diferentes equipos volumétricos y cualquier otra fuente que afecte de forma aleatoria la determinación.

b- Los equipos de medición volumétrica utilizados en el volumen final de elución, volumen de reacción con ditionito o de la dilución de la muestra presentan incertidumbres que pueden afectar la medición, las mismas se consideran que han sido valoradas en el coeficiente de variación porcentual del control positivo preparado en riñón de 1,75 ug/g, sin embargo, se utiliza el valor de tolerancia del equipo como su estimador de incertidumbre y valorar su influencia como fuente.

c- El análisis presenta una fuente de incertidumbre sistemática asociada al sesgo de la metodología, la cual es valorada por medio del sesgo% del control positivo preparado en riñón de 1,75 ug/g.

d- Los parámetros del ajuste lineal (pendiente e intercepto) pueden ocasionar una fuente de incertidumbre en el valor cuantitativo de la metodología, esta fuente es valorada dentro del sesgo% y el coeficiente de variación porcentual del control positivo preparado en riñón de 1,75 ug/g.

e-La masa de muestra de riñón utilizada presenta una incertidumbre asociada su medición.

f- Variabilidad total del método, la falta de veracidad del método está influenciada por errores sistemáticos (valorados por el sesgo) y errores aleatorios (valorados por la precisión). Dentro de esta fuente de incertidumbre están asumidas todas las fuentes anteriores: las incertidumbres de los volúmenes medidos en el proceso de preparación de la muestra, la influencia por la utilización de los parámetros del ajuste en la estimación de una concentración, diferentes preparaciones de reactivos, diferentes analistas, el sesgo y la reproducibilidad del método.

4. Cuantificar la variabilidad de cada fuente:

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 32 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPIRIDIOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	

a- Reproducibilidad de la medición: cuantificada por el coeficiente de variación porcentual del control positivo preparado en riñón de 1,75 ug/g, el mismo es preparado a partir de un material de referencia certificado de paraquat. Para la estimación de este parámetro se utilizaron 32 datos de las mediciones de absorbancias del control y el blanco de riñón, las mediciones fueron realizadas en un periodo aproximado de dos años.

Control preparado de paraquat	
1,749 ± 0,074 ug/g	U% (95%,k:2): 4,2%

Promedio ug/g	1,70
RSD%	16,9
n	32
sesgo%	-3,00

b Incertidumbre de los equipos de medición volumétrica utilizados en la dilución y reducción de la muestra: se utiliza las tolerancias asignadas a cada equipo:

Equipo	Tolerancia %
Micropipetas	2,5
Balón aforado 5mL	0,50
Balón aforado 50mL	0,12

c- Sesgo de la metodología: cuantificada por medio del sesgo% del control positivo preparado en riñón de 1,75 ug/g. El valor del sesgo% obtenido (-3%) es varias veces menor que la influencia del componente de reproducibilidad de la metodología (17%). Se considera que el sesgo ya está valorado dentro del componente de reproducibilidad de la metodología. Por lo anterior, se utilizará la incertidumbre asociada al valor asignado del control positivo y de los calibradores de la curva de calibración. Se utilizó la siguiente formula en la preparación de la disolución madre de paraquat para el control y los calibradores:

$$Cn_{madre} = \frac{M_{MR} \times \frac{P_{MR}}{100} \times \frac{PM_{PQ}}{PM_{MR}}}{V_f} \times 10^6$$

Donde:

$Cn_{madre}$  = Concentración de la disolución madre en  $\mu\text{g/mL}$ .

$M_{MR}$  = Masa del material de referencia en g.

$P_{MR}$  = Porcentaje de pureza del material de referencia .

$PM_{PQ}$  = Peso molecular del paraquat (257,16 g/mol).

$PM_{MR}$  = Peso molecular del material de referencia en g/mol. (4 x H<sub>2</sub>O = 329,22)



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 33 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPYRIDILOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	

$V_f$  = Volumen final de la disolución en mL.

Control preparado de paraquat	
1,749 ± 0,074 ug/g	U% (95%,k:2): 4,2%

Calibradores preparados de paraquat				
xi	u(xi)	u(xi)/xi	u(xi)%	U(xi)% (95%,k:2):
1,000	0,021	0,021	2,1	4,2
1,500	0,032	0,021	2,1	4,2
2,500	0,053	0,021	2,1	4,2
7,50	0,16	0,021	2,1	4,2
10,00	0,21	0,021	2,1	4,2
15,00	0,32	0,021	2,1	4,2

e- Para el análisis de acuerdo con lo indicado en el PON se utiliza una masa de  $10,0 \pm 0,1$  g de rinón. La medición de la masa se realiza con una balanza calibrada y verificada que presenta una incertidumbre expandida de 0,0084 g (U:  $k = 2$ ; 95 %), sin embargo, por practicidad en el análisis la masa utilizada tiene una tolerancia de  $\pm 0,1$  g.

Masa (g)	Tolerancia (g)	Tolerancia (%)
10	0,1	1,00

f- Como estimador de la variabilidad total del método se utilizó la combinación de las fuentes anteriores, como lo muestra el siguiente cuadro:

Fuente de Incertidumbre	Tipo	RSD, U o tolerancia (%)	Modelo de distribución	Divisor	Incertidumbre estándar
Reproducibilidad de la metodología (RSD%)	A	16,9	Normal	1	16,9
Volumen de eluido 50 mL, medido con balón aforado (T%)	B	0,12	Rectangular	$\sqrt{3}$	0,069
Volumen alicuota de eluido 2,5 mL, medido con micropipeta (T%)	B	2,50	Rectangular	$\sqrt{3}$	1,44
Volumen de ditionito 0,5 mL, medido con micropipeta (T%)	B	2,50	Rectangular	$\sqrt{3}$	1,44
Incertidumbre de calibradores U% (95%,k:2)	B	4,2	Normal	2	2,10
Masa de la muestra, medida con balanza (T%)	B	1	Rectangular	$\sqrt{3}$	0,58
Incertidumbre de control U% (95%,k:2)	B	4,2	Normal	2	2,10
Volumen de dilución, medido con micropipeta (T%)	B	2,50	Rectangular	$\sqrt{3}$	1,44
<b>u%:</b>					17,4
<b>U% (k:2, 95,45%):</b>					35

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 34 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPIRIDIOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	

5.1 Estimación de concentración de la muestra y su incertidumbre combinada: se realiza la interpolación de la concentración en la curva de calibración ponderada de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$C_{PQ} = \frac{((A_m - A_b) \times F) - b}{m} \times \frac{M_t}{M_m}$$

Sustituyendo: 
$$C_{PQ} = \frac{((0,0419 - 0,0039) \times 1) - 0,0020}{0,02108} \times \frac{10}{10} \quad C_{PQ} = 1,708 \text{ ug/g}$$

La incertidumbre combinada para el valor  $x_0$  interpolado, de acuerdo con la fórmula general de combinación de incertidumbre, se obtiene a partir de la expresión general:

$$u_c(x_0) = \sqrt{\sum_{i=1}^N c_i^2 \cdot u_i^2}$$

Por lo que la incertidumbre se estima combinando las incertidumbres porcentuales provenientes de las diferentes fuentes que aportan a la variabilidad total del método presentaría la siguiente fórmula:

$$u_c(C_m) \% = \sqrt{[u_c(F_{mt}) \%]^2}$$

$$u_c(C_m) \% = \sqrt{[RSD\%]^2 + [u(\text{masa muestra})]^2 + [u(\text{controles y calibradores})]^2 + [u(\text{equipovolumétrico})]^2}$$

Sustituyendo obtenemos:

$$u_c(C_m) \% = \sqrt{[16,9\%]^2 + [0,58\%]^2 + [2,10\%]^2 + [2,10\%]^2 + [0,069\%]^2 + [1,44\%]^2 + [1,44\%]^2 + [1,44\%]^2}$$

$$u_c(C_m) \% = 17,4\%$$

$$uc(C_m) = 17,4 \% \text{ de } 1,708 \text{ ug/g}$$

$$uc(C_m) = 0,30 \text{ ug/g}$$

$$U(C_m) = uc(C_m) * k = 0,30 \text{ ug/g} * 2 = 0,60 \text{ ug/g}$$

A continuación, se presenta un cuadro resumen de los aportes de las diferentes componentes de la incertidumbre de la concentración de analito en la muestra ( $C_m$ ) y un gráfico que ilustra su porcentaje de aporte:

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES				VERSIÓN 03	PAGINA: 35 de 39
DETERMINACIÓN BIPYRIDILOS ESPECTROFOTOMETRÍA	CUALITATIVA EN MATRICES	Y	CUANTITATIVA BIOLÓGICAS	DE POR	P-DCF-ECT-TOX-017

Componente	$V_{eff}$	$u\%$	$(u\%)^2$	Aporte %
Reproducibilidad (RSD%)	31	16,9	285,61	94,88
Volumen de eluido (T%)	10000	0,069	0,00480	0,0016
Volumen alicuota de eluido (T%)	10000	1,44	2,083	0,69
Volumen de ditonito (T%)	10000	1,44	2,083	0,69
Calibradores U% (95%,k:2)	10000	2,10	4,410	1,47
Masa de la muestra (T%)	10000	0,58	0,333	0,11
Control U% (95%,k:2)	10000	2,10	4,410	1,47
Volumen de dilución (T%)	10000	1,44	2,083	0,69
<b><math>V_{eff} (Cm):</math> 34</b>		<b><math>\Sigma:</math> 301,02</b>		



El aporte de las fuentes correspondientes a los equipos volumétricos y la medición de masa utilizados en el proceso de preparación de las muestras es menor al 1% para cada fuente, por lo que para este caso se pueden desestimar como fuentes de incertidumbre, las mismas se podría considerar que han sido valoradas en el coeficiente de variación porcentual del control positivo preparado en riñón de 1,75 ug/g.

6.1 Se elije para el caso en particular como probabilidad de cobertura un 0,9545 (95,45%).

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 36 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPIRIDILOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	

7.1 Se cumple el teorema del límite central, por cuanto todas las fuentes de incertidumbre importantes tienen distribuciones normales o se asumen en el tratamiento como normales. Como los grados de libertad efectivos calculados con la fórmula de Welch-Satterwaite, son altos (34), se utiliza como factor de cobertura un valor z normal, correspondiente con una probabilidad de cobertura de 95,45%, el cual es 2.

8.1 Informe de la concentración y su incertidumbre:

$$C = (1,71 \pm 0,60) \text{ ug/g } (k = 2; p = 0,9545; \text{normal})$$

De acuerdo con el resultado anterior, el valor verdadero de la concentración del analito en riñón se encontrará con una probabilidad del 95,45%, dentro del intervalo normal que está delimitado por los valores de concentración entre 1,11 ug/g y 2,31 ug/g, con estimador estadístico de tendencia central en 1,71 ug/g.

En el siguiente cuadro se muestran las incertidumbres expandidas de diferentes niveles de concentración distribuidos en el ámbito de análisis:

Incertidumbres en el ámbito de medición	
Paraquat ug/g	U (k:2, 95,45%)
1,00	0,35
1,50	0,52
2,50	0,87
7,5	2,6
10,0	3,5
15,0	5,2

5.2 Estimación de concentración de la muestra y su incertidumbre combinada: se realiza la interpolación de la concentración en la curva de calibración ponderada de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$C_{PQ} = \frac{((A_m - A_b) \times F) - b}{m} \times \frac{M_t}{M_m}$$

Sustituyendo:

$$C_{PQ} = \frac{((0,0419 - 0,0039) \times 1) - 0,0020}{0,02108} \times \frac{10}{10} \quad C_{PQ} = 1,708 \text{ ug/g}$$

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 37 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPIRIDILOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	

La incertidumbre combinada para el valor  $x_0$  interpolado, de acuerdo con la fórmula general de combinación de incertidumbre, se obtiene a partir de la expresión general:

$$u_c(x_0) = \sqrt{\sum_{i=1}^N c_i^2 \cdot u_i^2}$$

Por lo que la incertidumbre se estima combinando las incertidumbres porcentuales provenientes de las diferentes fuentes que aportan a la variabilidad total del método presentaría la siguiente fórmula:

$$u_c(C_m) \% = \sqrt{[u_c(F_{mt}) \%]^2}$$

$$u_c(C_m) \% = \sqrt{[RSD\%]^2 + [u(\text{controles y calibradores})]^2}$$

Sustituyendo obtenemos:

$$u_c(C_m) \% = \sqrt{[16,9\%]^2 + [2,10\%]^2 + [2,10\%]^2}$$

$$u_c(C_m) \% = 17\%$$

$$u_c(C_m) = 17\% \text{ de } 1,708 \text{ ug/g}$$

$$u_c(C_m) = 0,29 \text{ ug/g}$$

$$U(C_m) = u_c(C_m) \cdot k = 0,29 \text{ ug/g} \cdot 2 = 0,58 \text{ ug/g}$$

A continuación, se presenta un cuadro resumen de los aportes de las diferentes componentes de la incertidumbre de la concentración de analito en la muestra ( $C_m$ ) y un gráfico que ilustra su porcentaje de aporte:

Fuente de Incertidumbre	Tipo	RSD, U o tolerancia (%)	Modelo de distribución	Divisor	Incertidumbre estándar
Reproducibilidad de la metodología (RSD%)	A	16,9	Normal	1	16,9
Incertidumbre de calibradores U% (95%,k:2)	B	4,2	Normal	2	2,10
Incertidumbre de control U% (95%,k:2)	B	4,2	Normal	2	2,10
<b>u%:</b>					17
<b>U% (k:2, 95,45%):</b>					34

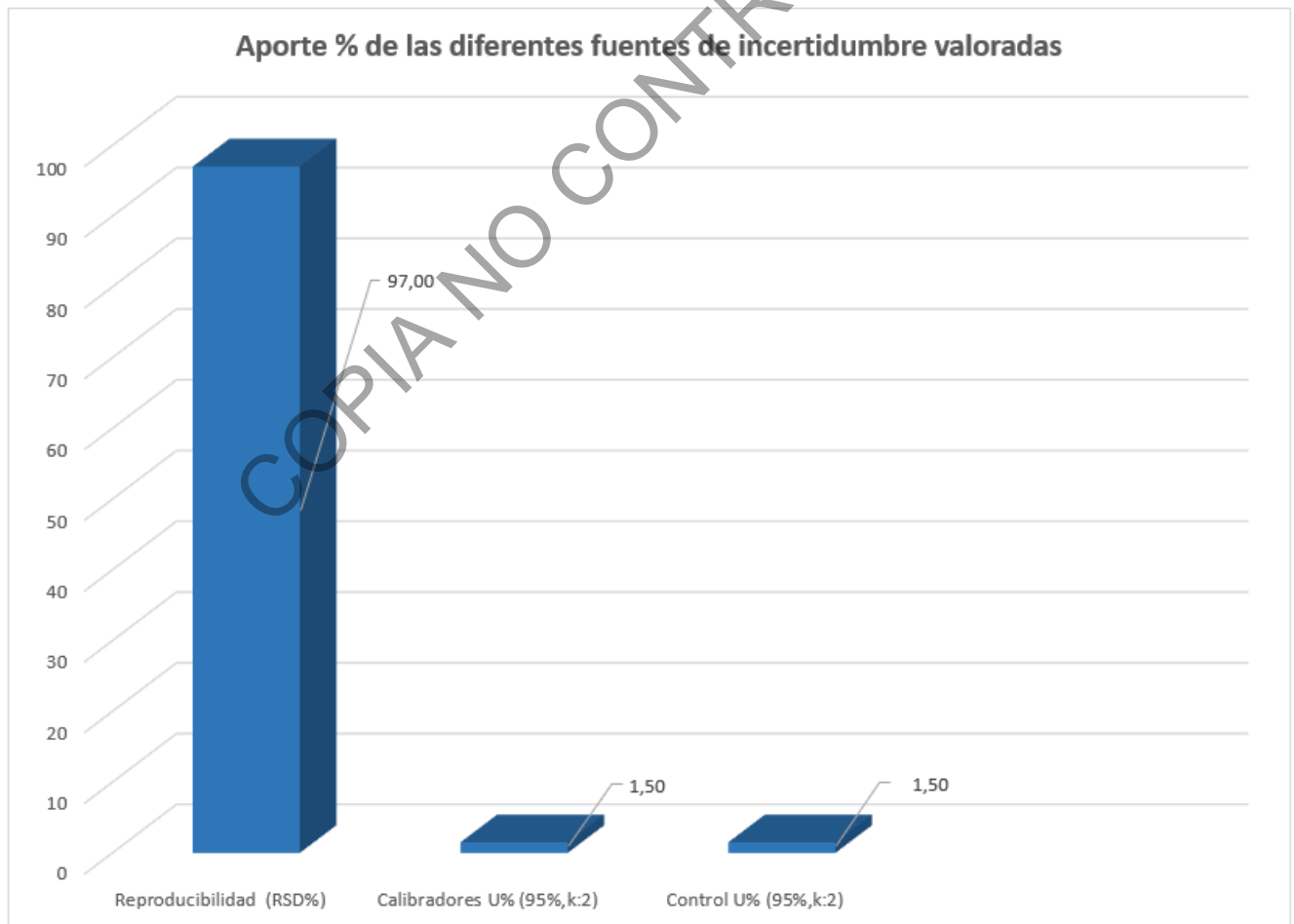
El aporte de las fuentes correspondientes a los equipos volumétricos utilizados en el proceso de preparación de las muestras y de la medición de la masa de la muestra se desestimó como

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 38 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPIRIDIOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	

fuentes de incertidumbre, las mismas se consideran que han sido valoradas en el coeficiente de variación porcentual del control positivo.

A continuación, se presenta un cuadro resumen de los aportes de las diferentes componentes que se consideraron importantes para la incertidumbre de la concentración de analito en la muestra ( $C_m$ ) y un gráfico que ilustra su porcentaje de aporte:

Componente	$V_{eff}$	$u\%$	$(u\%)^2$	Aporte %
Reproducibilidad (RSD%)	31	16,9	285,61	97,00
Calibradores U% (95%,k:2)	10000	2,10	4,410	1,50
Control U% (95%,k:2)	10000	2,10	4,410	1,50
<b><math>V_{eff} (C_m):</math> 33</b>		<b><math>\Sigma:</math> 294,43</b>		



6.2 Se elije para el caso en particular como probabilidad de cobertura un 0,9545 (95,45%).

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 39 de 39
DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIPIRIDILOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	P-DCF-ECT-TOX-017	

7.2 Se cumple el teorema del límite central, por cuanto todas las fuentes de incertidumbre importantes tienen distribuciones normales o se asumen en el tratamiento como normales. Como los grados de libertad efectivos calculados con la fórmula de Welch-Satterwaite, son altos (33), se utiliza como factor de cobertura un valor z normal, correspondiente con una probabilidad de cobertura de 95,45%, el cual es 2.

8.2 Informe de la concentración y su incertidumbre:

$$C = (1,71 \pm 0,58) \text{ ug/g } (k = 2; p = 0,9545; \text{normal})$$

De acuerdo con el resultado anterior, el valor verdadero de la concentración del analito en riñón se encontrará con una probabilidad del 95,45%, dentro del intervalo normal que está delimitado por los valores de concentración entre 1,13 ug/g y 2,29 ug/g, con estimador estadístico de tendencia central en 1,71 ug/g.

En el siguiente cuadro se muestran las incertidumbres expandidas de diferentes niveles de concentración distribuidos en el ámbito de análisis:

Incertidumbres en el ámbito de medición	
Paraquat ug/g	U (k:2, 95,45%)
1,00	0,34
1,50	0,51
2,50	0,86
7,5	2,6
10,0	3,4
15,0	5,1