

UNIVERSIDAD NACIONAL

Campus Omar Dengo

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE QUÍMICA

MODIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA PLAGUICIDAS
ORGANOFOSFORADOS POR QuEChERS–GC/MSD-EI EN CERVEZA Y JUGO DE
MANZANA

Trabajo sometido a consideración del Tribunal Examinador de la Escuela de Química,
como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Química Industrial

B.Q. Beatriz Alejandra Guerrero Gamboa

M.Sc. Manuel Oreamuno Zepeda
M.Sc. José Pablo Sibaja Brenes
Máster Rolando Sánchez Gutiérrez

Heredia

Julio, 2022

“Este trabajo de graduación fue aprobada con calificación de 87.5 por el tribunal Examinador de la Escuela de Química de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Química Industrial”

Miembros del Tribunal Examinador del Trabajo Final de Graduación:

	NOMBRE	FIRMA
Representante decano	del M.Sc. Randall Syedd León	<hr/>
Representante director de la Escuela	del M.Sc. Orlando Armijo Montes	<hr/>
Tutor	M.Sc. Manuel Oreamuno Zepeda	<hr/>
Asesor	M.Sc. José Pablo Sibaja Brenes	<hr/>
Asesor	Máster Rolando Sánchez Gutiérrez	<hr/>
Lector	Lic. Leonardo Mena Rivera	<hr/>
Proponente	B.Q. Beatriz Guerrero Gamboa	<hr/>

Resumen

En Costa Rica, el Código Penal (Ley N° 4573) tipifica los delitos contra la vida, y la Ley de Bienestar Animal (Ley N° 7451) tipifica como delito los actos crueles, maltratos o muerte ocasionada de animales.^{7,8} En algunos de estos casos judiciales se han encontrado el uso de insecticidas (organoclorados, organofosforados, *N*-metilcarbamatos y piretroides) y herbicidas (fenoxiácidos, glifosato y bipiridilos).⁹ Los insecticidas organofosforados y los *N*-metilcarbamatos son las sustancias con las propiedades más tóxicas para el ser humano y otros mamíferos.¹⁰

Por la relación de estas sustancias tóxicas en la investigación criminal el Departamento de Ciencias Forenses, requiere de una metodología multicomponente para la caracterización cualitativa de los plaguicidas organofosforados forato, etoprofós, diazinón, metilparatión, malatión y clorpirifós en bebidas adulteradas (cerveza y jugo de manzana). La técnica seleccionada incluyó una modificación de la metodología de extracción para residuos de plaguicidas (EN15662-2008) en cereales y vegetales y el desarrollo de un método cualitativo por cromatografía de gases con detección por espectrometría de relación masa carga. Los criterios de caracterización utilizados están basados en recomendaciones de grupos científicos rectores en química forense.^{7,8,13}

La validación de la metodología demostró selectividad al ser evaluada con criterios cualitativos establecidos por la Agencia Mundial antidoping WADA¹⁵, con porcentajes de recuperación en cerveza desde 92.4 % hasta 98.2 % y en jugo de manzana desde 93.1 % hasta 99.0 % y límites de detección en cerveza desde 0.728 mg/L hasta 1.86 mg/L y en jugo de manzana desde 0.485 mg/L hasta 1.24 mg/L, siendo estos menores que la dosis letal media del analito más tóxico. Lo anterior demuestra que la metodología aportada es adecuada para el propósito para el que fue diseñado.

La evaluación de la recuperación en otras marcas de cerveza y bebidas de manzana reveló que es importante verificar el desempeño de la metodología en cada matriz particular antes de reportar un resultado cualitativo. Un factor crítico en el análisis de cerveza es la concentración de etanol ya que entre 5 mL/100 mL y 12 mL/100 mL se presentó pérdidas importantes de recuperación. Lo anterior podría provocar falsos negativos por una baja recuperación o por no cumplir con los criterios de identificación.

Se concluyó que la metodología propuesta en este proyecto de graduación puede ser aplicada a bebidas de cerveza y jugo de manzana cuestionadas en un proceso judicial por la adulteración intencional con los plaguicidas organofosforados etoprofós, malatión, metilparatión, clorpirifós, forato y diazinón.

Agradecimientos

Este trabajo se logró concluir gracias al aporte invaluable de varias personas.

A Manuel Oreamuno Zepeda por su guía, consejo, tiempo de dedicación y apoyo desde el inicio hasta la conclusión de este.

A Ronald Castro Esquivel por su asesoría, apoyo y colaboración durante la realización de este trabajo.

Al Departamento de Ciencias Forenses del Organismo de Investigación Judicial, especialmente a Patricia Fallas Meléndez y a Mauricio Chacón Hernández por permitirme realizar este proyecto brindando todo lo necesario y aprobando la realización de este.

A mis amigas que me animaron a seguir adelante y a mis compañeros y colegas de la Sección de Química Analítica.

Dedicatorias

A Dios por toda la fe, fortaleza, ánimo, salud y esperanza que me ha dado a lo largo de mi vida.

A mi familia, mi papá, mi mamá y mis dos hermanos por sus consejos, su apoyo y aliento que me han brindado durante todos estos años.

“Y todo lo que hacéis, de palabra o de hecho, hacedlo todo en el nombre del Señor Jesús, dando gracias por medio de El a Dios el Padre.” Colosenses 3,17

Contenido

Resumen	iii
Agradecimientos	v
Dedicatorias.....	vi
Contenido	vii
Índice de figuras	xi
Índice de cuadros	xv
Abreviaturas	xvii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes y justificación	2
Capítulo 2. Marco teórico	4
2.1. Plaguicidas: compuestos organofosforados	5
2.2. Compuestos organofosforados: mecanismo de acción tóxica.....	7
2.3. Métodos de análisis para plaguicidas.....	10
2.4. Método de extracción por QuEChERS	11
2.5. Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas	12
2.5.1. Sistema de gas portador	13
2.5.2. Sistema de inyección de muestras y autoinyector.....	13
2.5.3. Columnas y hornos	15
2.5.4. Detectores.....	16
2.6. Estándar interno	18
2.7. Análisis cualitativo en química forense.....	19
2.8. Criterios Horwitz y Westgard en la evaluación de metodologías cuantitativas que involucran extracción	24
2.9. Validación de métodos cualitativos.....	25
Capítulo 3. Objetivos	28
3.1. Objetivo general	29
3.2. Objetivos específicos.....	29
Capítulo 4. Metodología	30
4.1. Reactivos y materiales	31
4.2. Matrices utilizadas en la validación	31

4.3.	Materiales de referencia	33
4.4.	Equipo utilizado	34
4.5.	Metodología de extracción por QuEChERS	35
4.6.	Desarrollo de la metodología instrumental	37
4.7.	Metodología de los parámetros de desempeño instrumentales para una metodología por GC/MSD-EI para la separación y caracterización de forato, malatión etoprofos, clorpirifós, diazinón y metilparatión.....	39
4.7.1.	Ámbito para el análisis cualitativo, linealidad y cedasticidad.....	39
4.7.2.	Límite de detección, selectividad y precisión	40
4.7.3.	Estabilidad de las disoluciones de los analitos.....	41
4.7.4.	Efecto memoria	41
4.8.	Metodología para la determinación de los parámetros de desempeño de la modificación del método QuEChERS EN15662:2008 para la extracción y la limpieza de forato, malatión, etoprofos, clorpirifós, diazinón y metilparatión, en una matriz de jugo de mazana y una matriz de cerveza	42
4.8.1.	Límite de detección en matriz	42
4.8.2.	Precisión intermedia.....	42
4.8.3.	Estabilidad del extracto en bandeja de inyección.....	43
4.8.4.	Estabilidad del extracto en refrigeración	43
4.8.5.	Eficiencia del método para la recuperación de los analitos.....	44
4.8.6.	Robustez: efecto de la composición del tubo d-SPE en la recuperación.....	45
4.8.7.	Veracidad	45
4.9.	Metodología para el análisis del efecto de las diferentes concentraciones de etanol en cerveza dopada y la evaluación del desempeño de la metodología validada en matrices diferentes de cervezas y jugos de manzana de acuerdo con los criterios de Horwitz y a los criterios de Westgard.....	47
4.9.1.	Rugosidad	47
4.9.2.	Robustez: efecto etanol.....	48
Capítulo 5.	Resultados y discusión.....	50
5.1.	Evaluación de los parámetros de desempeño instrumentales para una metodología por GC/MSD-EI para la separación y caracterización de forato, malatión etoprofos, clorpirifós, diazinón y metilparatión.....	51
5.1.1.	Establecimiento de las condiciones cromatográficas y de detección	51
5.1.2.	Selección de iones principales	55

5.1.3.	Calibración dinámica	56
5.1.4.	Ámbito para el análisis cualitativo	57
5.1.5.	Límite de detección	59
5.1.6.	Selectividad	61
5.1.7.	Efecto memoria	64
5.1.8.	Estabilidad de la disolución intermedia	65
5.2.	Determinación de los parámetros de desempeño de la modificación del método QuEChERS EN15662:2008 para la extracción y la limpieza de forato, malatión, etoprofos, clorpirifós, diazinón y metilparatión, en una matriz de jugo de manzana y una matriz de cerveza	66
5.2.1.	Límite de detección en matriz	66
5.2.2.	Precisión intermedia.....	67
5.2.3.	Estabilidad del extracto en bandeja de inyección.....	68
5.2.4.	Estabilidad del extracto en refrigeración	70
5.2.5.	Eficiencia del método para la recuperación de los analitos y efecto matriz	72
5.2.6.	Robustez: efecto resinas del tubo d-SPE.....	78
5.2.7.	Veracidad	80
5.3.	Evaluación del desempeño de la metodología validada en matrices diferentes de cervezas y jugos de manzana de acuerdo con los criterios de Horwitz y a los criterios de Westgard y el efecto de las diferentes concentraciones de etanol en cerveza dopada	82
5.3.1.	Rugosidad	82
5.3.2.	Robustez: efecto etanol.....	90
Capítulo 6.	Conclusiones y recomendaciones.....	94
Capítulo 7.	Referencias bibliográficas	97
Capítulo 8.	Anexos	106
8.1.	Anexo 1: Diagrama de la metodología de extracción oficial por QuEChERS de la Norma Europea EN15662:2008	107
8.2.	Anexo 2: Calibración dinámica de los iones principales	108
8.3.	Anexo 3: Estructuras de los fragmentos positivos más abundantes del ión base y un ión calificador para cada analito	114
8.4.	Anexo 4: Espectros de masas de los analitos y del estándar interno.....	116

8.5. Anexo 5: Curvas de calibración utilizadas para el cálculo de los porcentajes de recuperación preparados con los extractos de cerveza o de jugo de manzana
118

Índice de figuras

Figura 1. Representación de las moléculas de (a) forato, (b) malatión, (c) etoprofós, (d) clorpirifós, (e) diazinón y (f) metilparatión. ²¹	6
Figura 2. Estructura general de los plaguicidas organofosforados. ¹⁰	8
Figura 3. Reacción general de la bioactivación. ¹⁰	8
Figura 4. Reacción de la acetilcolina y de clorpirifós-oxón con la acetilcolinesterasa. ¹⁰ ..	9
Figura 5. Diagrama de bloques de un cromatógrafo de gases típico. ⁵⁹	13
Figura 6. Inyector split/splitless, vista transversal. ⁵⁹	14
Figura 7. Diagrama de bloques de los componentes de un espectrómetro de masas. ⁵⁹	16
Figura 8. Diagrama de un analizador de masa tipo cuadrupolar. ⁵⁹	17
Figura 9. Representación gráfica de Westgard. ⁷⁸	25
Figura 10. Fotografía del cromatógrafo de gases Agilent Technologies modelo 7890A con detector 5975C. ⁸²	35
Figura 11. Diagrama de la metodología de extracción por QuEChERS validada.....	36
Figura 12. En la figura izquierda se muestra las fresas ya procesadas en el ultra turrax y en la figura de la derecha las fresas antes y después de haber sido procesadas.....	46
Figura 13. Etapa de preparación inicial del procedimiento de extracción de las fresas procesadas y dopadas por medio del método QuEChERS EN15662:2008 oficial y del método QuEChERS EN15662:2008 modificado.	46
Figura 14. Espectros de masa de a. trifenilfosfato, b. antraceno y c. tetrafeniletileno... 52	
Figura 15. Cromatograma de los analitos junto con los estándares internos adquiridos en modo SCAN y en modo SIM para la concentración 3.75 mg/L.....	55
Figura 16. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 126.00 m/z para el etoprofós.....	57
Figura 17. Resultado del efecto memoria del etoprofós en el blanco instrumental.....	64
Figura 18. Promedio de las estabildades de los extractos (2α , n = 5) en cerveza, de los analitos en la bandeja de inyección.....	69
Figura 19. Promedio de las estabildades de los extractos (2α , n = 5) en jugo de manzana, de los analitos en la bandeja de inyección.	69
Figura 20. Promedio de las estabildades de los extractos (2α , n = 5) en cerveza, de los analitos en refrigeración.	71
Figura 21. Promedio de las estabildades de los extractos (2α , n = 5) en jugo, de manzana de los analitos en refrigeración.....	72
Figura 22. Cromatograma en SCAN del extracto de los analitos a 5.00 mg/L en cerveza.	73
Figura 23. Cromatograma en SCAN del extracto de los analitos a 5.00 mg/L en jugo de manzana.....	73
Figura 24. Efecto matriz en cerveza expresado como porcentaje de recuperación (2α , n = 5).	74

Figura 25. Promedio de los extractos de los analitos en jugo de manzana para el efecto matriz (2α , $n = 5$).	74
Figura 26. Curva de calibración de forato preparada con el extracto en cerveza sin dopar.	76
Figura 27. Porcentajes de recuperación (2α , $n = 3$) de los extractos en cerveza de los analitos a diferentes concentraciones.	76
Figura 28. Curva de calibración de malatión preparada con el extracto en jugo de manzana sin dopar.	77
Figura 29. Porcentajes de recuperación (2α , $n = 3$) de los extractos en jugo de manzana de los analitos a diferentes concentraciones.	78
Figura 30. Porcentajes de recuperación (2α , $n = 6$) de los extractos en cerveza de los analitos en diferentes mezclas de resinas.	79
Figura 31. Porcentajes de recuperación (2α , $n = 6$) de los extractos en jugo de manzana de los analitos en diferentes mezclas de resinas.	79
Figura 32. En la figura a. se muestran las matrices de cerveza antes de la extracción y en la figura b. en el mismo orden las matrices después de la extracción.	82
Figura 33. Porcentajes de recuperación (2α , $n = 6$) en diferentes marcas de cerveza a una concentración de 3.75 mg/L de los analitos.	83
Figura 34. En la figura a. se muestran las matrices de bebidas de manzana antes de la extracción y en la figura b. en el mismo orden las matrices después de la extracción.	84
Figura 35. Porcentajes de recuperación (2α , $n = 6$) en diferentes marcas de jugo de manzana a una concentración de 3.75 mg/L de los analitos.	84
Figura 36. Valoración del desempeño de la metodología QuEChERS según Westgard en diferentes marcas de cerveza con un porcentaje de sesgo del 20 %.	86
Figura 37. Valoración del desempeño de la metodología QuEChERS según Westgard en diferentes marcas de cerveza con un porcentaje de sesgo del 30 %.	86
Figura 38. Valoración del desempeño de la metodología QuEChERS según Westgard en diferentes marcas de jugo de manzana con un porcentaje de sesgo del 10 %.	88
Figura 39. Valoración del desempeño de la metodología QuEChERS según Westgard en diferentes marcas de jugo de manzana con un porcentaje de sesgo del 20 %.	88
Figura 40. Valoración del desempeño de la metodología QuEChERS según Westgard en diferentes marcas de jugo de manzana con un porcentaje de sesgo del 30 %.	89
Figura 41. Porcentaje de recuperación del etanol en los diferentes analitos estudiados.	91
Figura 42. Valoración del desempeño de la metodología QuEChERS según Westgard a diferentes porcentajes de etanol con un porcentaje de riesgo del 20 %.	92
Figura 43. Valoración del desempeño de la metodología QuEChERS según Westgard a diferentes porcentajes de etanol con un porcentaje de riesgo del 30 %.	92
Figura 44. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 139.10 m/z de etoprofos.	108

Figura 45. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 158.00 m/z de etoprofos.....	108
Figura 46. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 200.00 m/z de etoprofos.....	108
Figura 47. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 75.10 m/z de forato.	108
Figura 48. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 97.00 m/z de forato.	109
Figura 49. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 121.05 m/z de forato.	109
Figura 50. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 231.00 m/z de forato.	109
Figura 51. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 137.10 m/z de diazinón.....	109
Figura 52. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 152.10 m/z de diazinón.....	110
Figura 53. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 179.15 m/z de diazinón.....	110
Figura 54. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 199.10 m/z de diazinón.....	110
Figura 55. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 79.10 m/z de metilparatión.....	110
Figura 56. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 109.10 m/z de metilparatión.....	111
Figura 57. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 125.00 m/z de metilparatión.....	111
Figura 58. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 263.00 m/z de metilparatión.....	111
Figura 59. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 125.00 m/z de malatión.....	111
Figura 60. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 127.05 m/z de malatión.....	112
Figura 61. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 158.00 m/z de malatión.....	112
Figura 62. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 173.10 m/z de malatión.....	112
Figura 63. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 196.90 m/z de clopirifós.....	112
Figura 64. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 198.95 m/z de clopirifós.....	113

Figura 65. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 257.90 m/z de clorpirifós.	113
Figura 66. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 314.00 m/z de clorpirifós.	113
Figura 67. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 253.20 m/z de tetrafeniletileno.	113
Figura 68. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 332.20 m/z de tetrafeniletileno.	113
Figura 69. Espectros de masas en modo SCAN de: a. etoprofós, b. forato, c. diazinón, d. metilparatión, e. malatión, f. clorpirifós.	117
Figura 70. Curva de calibración de etoprofos en extracto de cerveza.	118
Figura 71. Curva de calibración de forato en extracto de cerveza.	118
Figura 72. Curva de calibración de diazinón en extracto de cerveza.	118
Figura 73. Curva de calibración de metilparatión en extracto de cerveza.	118
Figura 74. Curva de calibración de malatión en extracto de cerveza.	119
Figura 75. Curva de calibración de clorpirifós en extracto de cerveza.	119
Figura 76. Curva de calibración de etoprofos en extracto de jugo de manzana.	119
Figura 77. Curva de calibración de forato en extracto de jugo de manzana.	119
Figura 78. Curva de calibración de diazinón en extracto de jugo de manzana.	119
Figura 79. Curva de calibración de metilparatión en extracto de jugo de manzana. ...	119
Figura 80. Curva de calibración de malatión en extracto de jugo de manzana.	119
Figura 81. Curva de calibración de clorpirifós en extracto de jugo de manzana.	119

Índice de cuadros

Cuadro I. Información de clasificación toxicológica, estatus legal, de polaridad, e importación de los analitos a evaluar en el presente proyecto.	7
Cuadro II. Clasificación de las técnicas analíticas cualitativas de acuerdo con su poder discriminante*	21
Cuadro III. Ámbitos de tolerancia máximos para la abundancia relativa de los iones. .	23
Cuadro IV. Información de las diferentes marcas de cervezas utilizadas en la validación.	31
Cuadro V. Información de las diferentes marcas de jugo de manzana utilizadas en la validación.....	32
Cuadro VI. Volúmenes de la disolución intermedia y de acetonitrilo utilizados para la preparación de disoluciones de trabajo. Se indica la concentración de cada nivel de calibración.	34
Cuadro VII. Condiciones cromatográficas del método validado.....	37
Cuadro VIII. Condiciones del detector del método validado.	38
Cuadro IX. Concentraciones utilizadas en la curva de calibración.	39
Cuadro X. Concentraciones utilizadas según la serie Fibonacci.	42
Cuadro XI. Diferencias de las condiciones entre el anterior y el actual método cromatográfico.	53
Cuadro XII. Iones base y calificadores con mayor abundancia en la calibración dinámica.	57
Cuadro XIII. Regresión lineal para los analitos evaluados intradía con tetrafeniletieno como estándar interno.....	58
Cuadro XIV. Regresión lineal para los analitos evaluados interdía con tetrafeniletieno como estándar interno.....	58
Cuadro XV. Resultados de la cedasticidad y la linealidad para la repetibilidad y para la reproducibilidad.	59
Cuadro XVI. Comparaciones entre las pendientes, interceptos y tipo de tratamiento de los LD entre repetibilidad y reproducibilidad.....	60
Cuadro XVII. Límites de detección de la repetibilidad y reproducibilidad.	60
Cuadro XVIII. Tiempos de retención para la curva de calibración intradía.	61
Cuadro XIX. Tiempos de retención para la curva de calibración interdía.	62
Cuadro XX. Intensidades relativas de los iones de los analitos para la curva de calibración intradía.....	62
Cuadro XXI. Intensidades relativas de los iones de los analitos para la curva de calibración interdía.	63

Cuadro XXII. Porcentajes de estabilidad a los dos meses de la disolución intermedia de los analitos..... 65

Cuadro XXIII. Porcentajes de estabilidad a los cuatro meses de la disolución intermedia de los analitos..... 65

Cuadro XXIV. Porcentajes de estabilidad a los seis meses de la disolución intermedia de los analitos..... 65

Cuadro XXV. Concentraciones utilizadas según la serie Fibonacci para el límite de detección en matriz. 66

Cuadro XXVI. Porcentajes de detección para los diferentes analistas en cerveza..... 67

Cuadro XXVII. Porcentajes de detección para los diferentes analistas en jugo de manzana..... 68

Cuadro XXVIII. Recuperaciones e intervalos de confianza (IC) obtenidas del método QuEChERS oficial, modificado y los resultados reportados del método QuEChERS.¹³ 81

Cuadro XXIX. Resultados de los sesgos para los diferentes métodos. 81

Abreviaturas

19 + 1: mezcla preparada con sulfato de magnesio anhidro y GCB en una relación en masa de 19:1

59 + 1: mezcla preparada con sulfato de magnesio anhidro y GCB en una relación en masa de 59:1

AChE: enzima acetilcolinesterasa

ANAB: Ente Nacional de Acreditación ANSI-ASQ de los Estados Unidos de América

ANT: antraceno

C18EC: resina de sílica modificada con cadenas de octadecilo

DCF: Departamento de Ciencias Forenses

GCB: carbón negro grafitizado

GC/MSD-EI: técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de relación masa/carga (m/z) de baja resolución con ionización por impacto electrónico

HPLC: técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia

IC: intervalo de confianza

LD₅₀: Dosis de la sustancia que produce la muerte de la mitad de una población de animales de prueba tras la ingesta de la sustancia indicada en la dosis por kg de peso corporal en un período de observación de 24 horas. Con alimentación *ad libitum* de los individuos

LDC: límite de cuantificación

LD: límite de detección

Log Kow: Coeficiente de partición octanol/agua

m/z: relación masa/carga de los iones en espectrometría de masas

mSPE: técnica micro extracción por fase sólida

NIST: Instituto Nacional de Estándares y Tecnología

OMS: Organización Mundial de la Salud

OSAC: Organización de comités del área científica para la ciencia forense

PCB: bifenilos policlorados

PSA: resina de sílica modificada con amina secundaria – primaria

PTV: temperatura de vaporización programable

QuEChERS: técnica de extracción por partición con acetonitrilo y limpieza por extracción en fase sólida dispersiva

SPE: técnica de extracción por fase sólida

SWGDRUG: siglas en inglés del Grupo Científico de Trabajo para el Análisis de Drogas Decomisadas

TDCPP: tris (1,3-dicloropropan-2-il) fosfato

TE: error total

TPE: tetrafeniletileno

TPP: trifenilfosfato

tr: tiempo de retención relativo. Razón del tiempo de retención del analito con el del estándar interno

UNDOC: Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito

WADA: Agencia Mundial Antidopaje

Capítulo 1. Introducción

1.1. Antecedentes y justificación

Se especula que la incidencia de casos de intoxicaciones con plaguicidas está relacionada con la disponibilidad de estas sustancias en el mercado costarricense.^{1,2,3,4} El Centro Nacional de Control de Intoxicaciones de Costa Rica reporta que, de las intoxicaciones registradas en el 2016, el 11.6 % fueron por plaguicidas. Esta cifra en el 2017 fue del 10.6 %.^{5,6} Si bien los datos anteriores son del sistema de salud costarricense y no incluyen una subclasificación de su relación con un delito, es común en los procesos judiciales la utilización de plaguicidas organofosforados en bebidas como armas químicas.

En Costa Rica, el Código Penal (Ley N° 4573) tipifica los delitos contra la vida, abarcando desde homicidios hasta tentativa o instigación al suicidio, y la Ley de Bienestar Animal (Ley N° 7451) tipifica como delito los actos crueles, maltratos o muerte ocasionada de animales.^{7,8} En algunos de estos casos judiciales se han encontrado el uso de insecticidas (organoclorados, organofosforados, *N*-metilcarbamatos y piretroides) y herbicidas (fenoxiácidos, glifosato y bupiridilos).⁹ De las familias de plaguicidas anteriores, los organofosforados y los *N*-metilcarbamatos son las sustancias con las propiedades más tóxicas para el ser humano y otros mamíferos.¹⁰

El Organismo de Investigación Judicial del Poder Judicial (OIJ) es el ente responsable de atender las investigaciones de estos delitos. Específicamente, el Departamento de Ciencias Forenses (DCF) del OIJ atiende las solicitudes de los Tribunales y del Ministerio Público, en las cuales son requeridas la identificación química de plaguicidas u otras sustancias tóxicas involucradas por su utilización como arma química contra la vida humana y el bienestar animal.¹¹

El DCF cuenta desde el 2012 con un procedimiento validado para el análisis cualitativo de plaguicidas polares en muestras de alimentos y bebidas adulteradas, que utiliza la técnica extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos de octadecilsilicio (C18EC) y detección por GC/MSD-EI.¹² En esta metodología de SPE el tiempo requerido para la etapa de extracción de un lote de 24 muestras es de aproximadamente 8 horas. La metodología presenta un sesgo de hasta el - 40 % al nivel de trabajo (15 mg/L) y utiliza diferentes tipos de disolventes orgánicos que generan una carga de residuos considerable.¹²

Desde el 2003, se han publicado numerosas aplicaciones para el análisis multiresiduos de plaguicidas con una técnica de extracción/partición en acetonitrilo seguida de una fase de extracción dispersiva en fase sólida conocida como QuEChERS (acrónimo en inglés para: “Quick (rápido), “Easy (fácil), “Cheap” (barato), “Effective” (efectivo), “Robust”

(robusto) y “Safe” (seguro)) que presenta ventajas en todos los aspectos detallados anteriormente por técnica de extracción en fase sólida.¹³

Adicionalmente, los criterios de identificación utilizados en la técnica implementada incluyen la comparación espectral contra una base de datos de espectros de masas comercial utilizando un algoritmo de comparación con un índice de comparación superior al 95 %.¹²

Por lo anterior, el DCF definió como proyecto modernizar la metodología actual multicomponente por SPE-GC/MSD para el análisis cualitativo de sustancias tóxicas en bebidas adulteradas que incluya una mayor eficiencia en la recuperación, menor generación de desechos y más rápida basada en una adaptación de la técnica de extracción QuEChERS¹³. Adicionalmente, la utilización de criterios de identificación robustos, basados en recomendaciones de grupos científicos internacionales en ciencias forenses.

Se propone con este proyecto final de graduación modificar el método oficial multiresiduos en frutas y vegetales EN15662:2008¹³ para su aplicación requerida en bebidas. Se selecciona como matrices cerveza y jugo de manzana ya que estas bebidas son comúnmente encontradas en escenas criminales por intoxicaciones y homicidios. Los seis plaguicidas seleccionados son los más comúnmente encontrados en casos de delitos contra la vida según estadísticas del DCF al momento de definir este trabajo de investigación.⁹

A nivel forense no existen criterios de identificación específicos para plaguicidas en bebidas y alimentos adulterados establecidos por una comunidad científica internacional. Por lo cual se tuvo que recurrir a entes normativos internacionales relacionados con el análisis cualitativa de sustancias orgánicas aceptados para su aplicación a nivel forense en Costa Rica. Estas son el Grupo Científico de Trabajo para el Análisis de Drogas Decomisadas (SWGDRUG)¹⁴ para el análisis cualitativo de drogas en materiales de decomiso, las establecidas por la Agencia Mundial Antidoping (WADA)¹⁵ para el análisis cualitativo de drogas en el control de dopaje en el deporte y las establecidas por la Organización de Comités de Área Científica para Ciencias Forenses (OSAC)¹⁶ para el análisis cualitativo de sustancias tóxicas en fluidos biológicos.

SWGDRUG propone la técnica GC/MSD como un esquema analítico completo para la identificación de drogas al analizar de forma independiente el tiempo de retención y el espectro de masas sin especificar los criterios de identificación. WADA y OSAC son explícitos en esto último.

Capítulo 2. Marco teórico

2.1. Plaguicidas: compuestos organofosforados

El artículo N° 2 del Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas define a los plaguicidas como cualquier sustancia o mezcla de éstas con ingredientes biológicos o químicos destinados a regular el crecimiento de las plantas o a repeler, destruir o controlar cualquier plaga como insectos, roedores, malas hierbas u otros organismos no deseados.^{10,17}

Los plaguicidas han sido usados desde tiempos antiguos. Se han encontrado archivos demostrando que alrededor del año 900 d.C. en China se utilizaba sulfuro de arsénico como insecticida. En la primera mitad del siglo XX se presentó el desarrollo de las principales clases de plaguicidas (organoclorados, organofosforados y fenoxiácidos).^{10,18}

Estos compuestos se pueden clasificar de diferentes formas: por tipo de plaga que controlan (por ejemplo: insecticidas, herbicidas, fungicidas y rodenticidas), por estructura química (organoclorados, organofosforados, *N*-metil-carbamatos, piretrinas, entre otros) y por su peligrosidad para el ser humano.¹⁹

Los organofosforados son compuestos orgánicos que incluyen en su estructura átomos de fósforo en grupos funcionales como, por ejemplo: fosforilo o tiofosforilo. Se han sintetizado cientos de estos compuestos, de los cuales más de doscientos se encuentran disponibles para uso y comercialización. Su aplicación va desde su uso como estabilizadores de plásticos y antioxidantes hasta aditivos de petróleo, pero se han utilizado principalmente como agentes nerviosos químicos de guerra y en el control fitosanitario como plaguicidas.²⁰

Por su estructura química los insecticidas organofosforados, son ésteres del ácido fosfórico y sus homólogos fosfónico, ditiofosfónico (estructuras a y b de la Figura 1), fosforoditioico (estructura c de la Figura 1) y tiofosfónico (estructuras d, e, y f de la Figura 1).²⁰

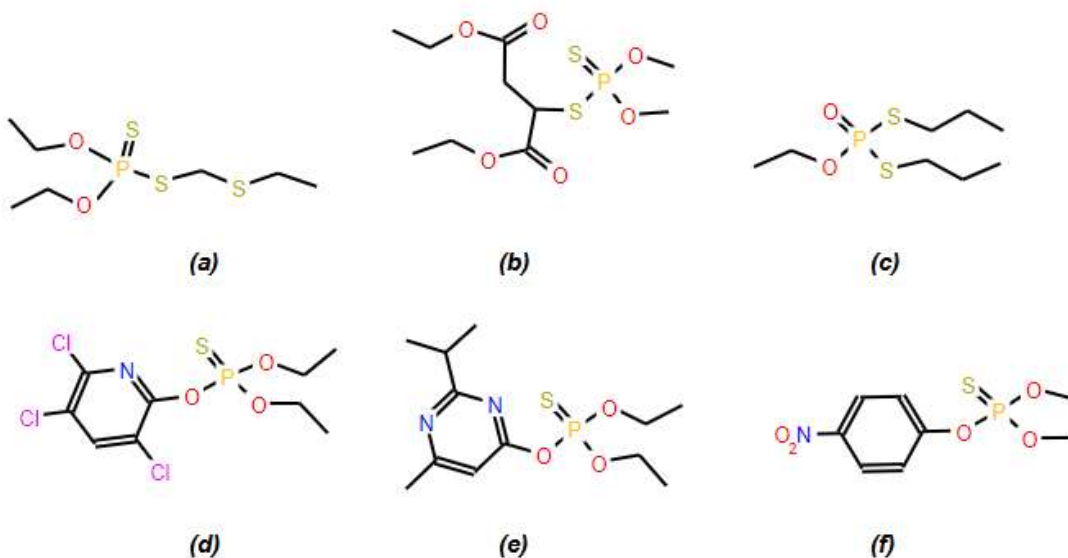


Figura 1. Representación de las moléculas de (a) forato, (b) malatión, (c) etoprofós, (d) clorpirifós, (e) diazinón y (f) metilparatión.²¹

Las formas más predominantes del fósforo son los compuestos con fósforo trivalente y pentavalente. Los analitos de esta validación incluyen la forma orgánica pentavalente el fósforo. La mayoría de las aplicaciones ambientales e industriales son del tipo pentavalente y por su amplio uso y semejanza con moléculas importantes para la vida como el ATP, fosfolípidos, proteínas de membrana, entre otras, se ha estudiado más detenidamente su toxicología en humanos.²⁰

Debido a que no se han encontrado alternativas adecuadas para reemplazarlos y por su amplio uso, se estima que entre 750 000 y 3 000 000 casos de intoxicaciones ocurren en el mundo cada año, como resultado de exposición ocupacional, intencional y accidental. La exposición a estos compuestos presenta signos de leves a graves asociados con la hiperestimulación del receptor colinérgico, esto porque actúan como toxinas inhibiendo la enzima colinesterasa.²⁰

La OMS clasifica los plaguicidas organofosforados que se van a utilizar en este proyecto, a partir de los valores reportados para el parámetro toxicológico LD₅₀, entre los niveles más tóxicos para los seres humanos en las clases I a (extremadamente peligroso), la clase II (moderadamente peligroso) y la clase III (ligeramente peligroso), ver Cuadro I.¹⁹

Cuadro I. Información de clasificación toxicológica, estatus legal, de polaridad, e importación de los analitos a evaluar en el presente proyecto.

Analito	LD50 (mg/kg) ^a	Clase ^b	Condición ^c	log Kow ^d	Importación en Costa Rica (kg) ^e
clorpirifós	135	II	Restringido	4.7	83 024
diazinón	300	II	Aprobado	3.3	313 867
etoprofós	62	Ia	Restringido	3.59	229 042
forato	2	Ia	Aprobado	3.92	29 148
malatión	2100	III	Aprobado	2.75	64 661
metilparatión	14	Ia	Restringido	3	1 267

a. Dato reportado como la dosis letal media en ratas en un período de observación de 24 horas. Con alimentación ad libitum de los individuos.¹⁹ b. La clasificación de los plaguicidas según la OMS establece la clase Ia y Ib para los plaguicidas más tóxicos ($LD_{50} < 50$ mg/kg p.c.) y la clase IV como la menos tóxica ($LD_{50} > 5000$ mg/kg p.c.).¹⁹ c. Restringido es que requiere receta profesional y aprobado que es de libre venta. Reglamentación de uso según MAG.^{22,23} d. Coeficiente de partición octanol/agua.²⁴ e. kilogramos de plaguicida importado durante el 2009 en Costa Rica.²⁵

Durante la segunda mitad del siglo XX se instauró el proceso registral de plaguicidas en Costa Rica al ser un gran consumidor, en el que se solicita información técnica para validar el uso o autorizar un registro. En la década de los ochenta se hicieron comunes los decretos nacionales en los que se implementaban restricciones a varios plaguicidas. Hoy en día su comercialización se ha visto afectada por varios cambios en la legislación estableciendo prohibiciones y restricciones de diversos tipos para algunos productos o usos específicos (Cuadro I).¹⁸

El coeficiente de octanol/agua (K_{ow}) es un valor de equilibrio de una sustancia en medio de dos fases: octanol y agua, la primer fase es un medio lipofílico no acuoso, mientras que el agua es hidrofílico.²⁶ Valores mayores de 4 del logaritmo de K_{ow} son compuestos no polares, valores entre 1.5 y 4 del logaritmo de K_{ow} son compuestos moderadamente polares y valores entre 1 y 1.5 del logaritmo de K_{ow} son compuestos polares.²⁷ Con base en lo anterior, los valores mostrados en el Cuadro I indican que el clorpirifos es no polar y los demás analitos moderadamente polares.

2.2. Compuestos organofosforados: mecanismo de acción tóxica

El objetivo principal de los organofosforados al ingresar en el cuerpo humano es la enzima acetilcolinesterasa (AChE), una β -esterasa cuya función fisiológica es el de hidrolizar la acetilcolina, un importante neurotransmisor en el sistema nervioso central y periférico.¹⁰ Para explicar su mecanismo de acción es importante conocer su estructura general, mostrada en la siguiente figura.¹⁰

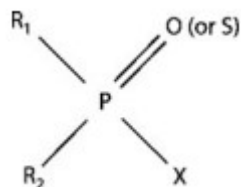


Figura 2. Estructura general de los plaguicidas organofosforados.¹⁰

Donde “x”, es el grupo saliente que se desplaza cuando el organofosforado fosforila la AChE. Sin embargo, los compuestos que tienen azufre unido al fósforo necesitan bioactivación metabólica para que realicen su actividad biológica, esto porque solo los compuestos con doble enlace entre el fósforo y el oxígeno son inhibidores eficaces de la AChE.¹⁰

Esta bioactivación es una desulfuración oxidativa llevada a cabo principalmente en el hígado, por las enzimas del citocromo P450, las cuales provocan la formación de un oxón o de un análogo de oxígeno del insecticida original. Esta reacción se muestra en la siguiente figura.¹⁰

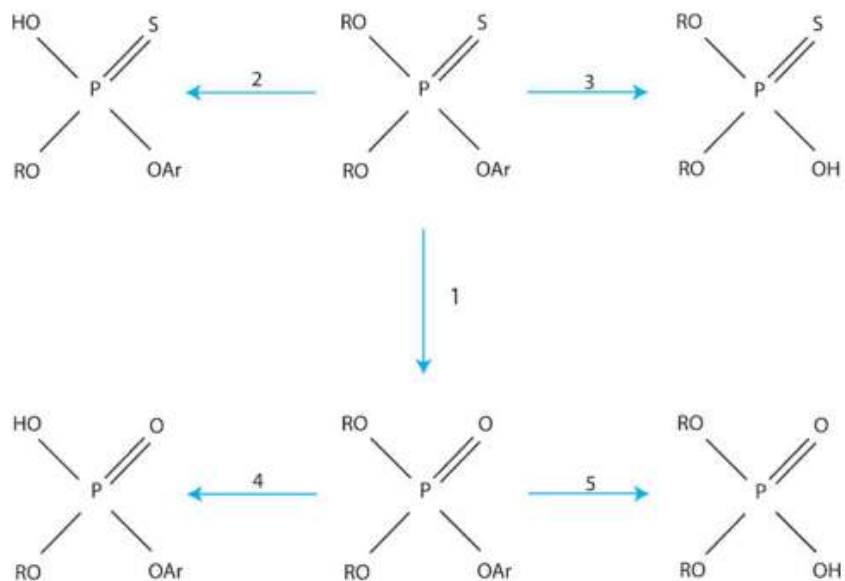


Figura 3. Reacción general de la bioactivación.¹⁰

La reacción 1 de la Figura 3 es la biotransformación del compuesto original al metabolito activo, el oxón; las otras reacciones son de desintoxicación enzimática que no involucra la inhibición de la AChE.¹⁰

Los estudios de la interacción de los organofosforados con la AChE han sido extensos, mostrando que los OP con un doble enlace entre el fósforo y el oxígeno fosforilan un hidroxilo de la serina en el sitio activo de la enzima, impidiendo su función sobre el sustrato fisiológico como se muestra en la siguiente figura.¹⁰

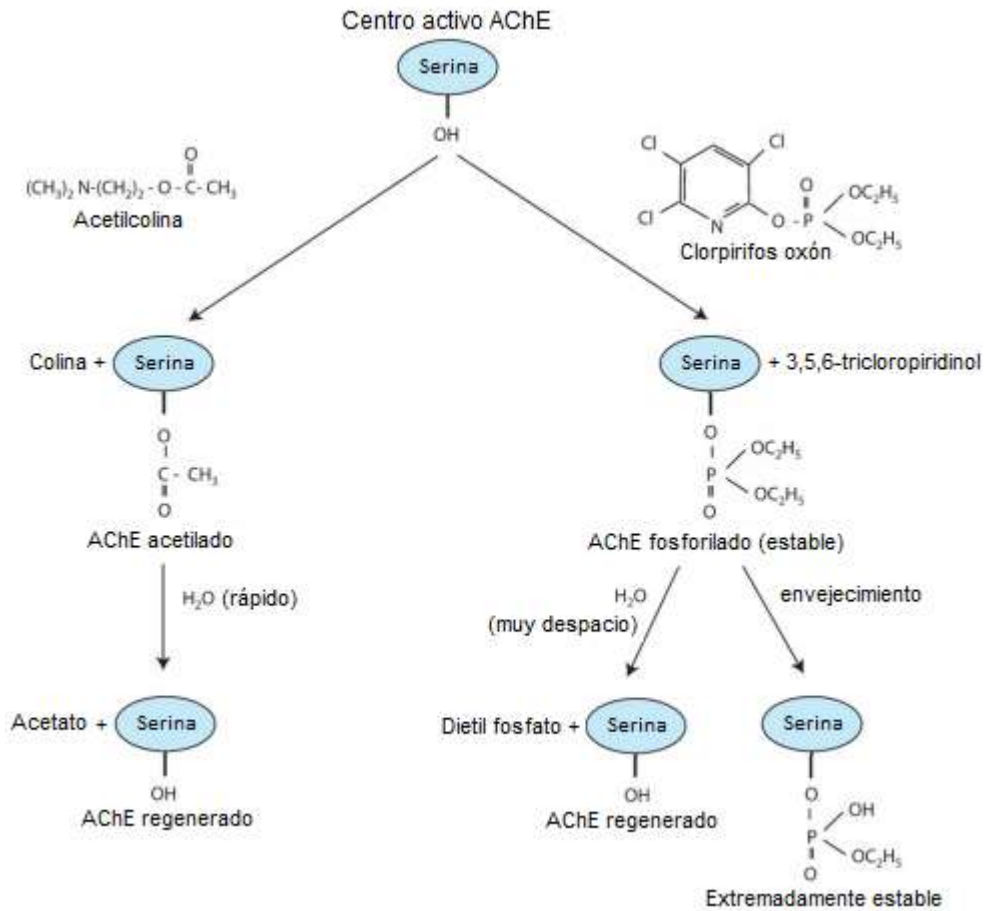


Figura 4. Reacción de la acetilcolina y de clorpirifós-oxón con la acetilcolinesterasa.¹⁰

En la Figura 4 a la izquierda se puede observar la reacción normal de la acetilcolina con el sitio activo de la enzima y como ésta escinde la acetilcolina y cómo se recupera la enzima. A la derecha, la primera reacción es de la AChE con el clorpirifós-oxón, formando un complejo y la segunda reacción la fosforilación de la AChE fosforilada. El enlace entre el átomo de fósforo con la enzima es mucho más estable que entre el carbono de la acetilcolina con la enzima, por lo que la ruptura del primer enlace puede durar horas o días dependiendo de la estructura del OP y del segundo enlace dura solo unos microsegundos.¹⁰

La inhibición de esta misma enzima por los organofosforados es la responsable de su efecto tóxico en humanos y otros mamíferos. Una intoxicación aguda con organofosforados aumenta los niveles de la acetilcolina en las sinapsis de los músculos

respiratorios (diafragma e intercostales), produciendo una parálisis de éstos con la consecuente muerte por asfixia. Adicionalmente, los organofosforados presentan toxicidad a nivel crónico, denominada “neurotoxicidad retardada”, que es caracterizada por dolores, debilidad y parálisis de las extremidades tras exposición del individuo a dosis subagudas.¹⁰

Si una persona sufre de intoxicación por OP es esencial su tratamiento de inmediato. En caso de exposición por la epidermis, lo ideal es retirar la ropa contaminada, lavar con agua y con jabón alcalino. Pero en los casos por ingestión no funcionan métodos donde se trate de reducir la adsorción en el trato digestivo, por ende, lo ideal es la administración del antídoto atropina, el cual es un antagonista de los receptores muscarínicos y en consecuencia previene la acción de acumular acetilcolina en estos receptores.²⁸

2.3. Métodos de análisis para plaguicidas

Debido a la alta toxicidad de los plaguicidas, su mal uso y a la bioacumulación se han implementado diferentes técnicas para la identificación con fines fitosanitarios. Dentro de las matrices más comunes se encuentran frutas y vegetales^{29,30,31,32}, agua^{32,33}, leche^{34,35}, miel^{36,37,38}, peces³⁹ y madera⁴⁰, utilizando métodos de extracción como microextracción por fase sólida (SPME)²⁸, microextracción dispersiva líquida-líquida³¹, extracción por fase sólida magnética³³, extracciones simples líquido/líquido³⁶, extracción por fase sólida (SPE)³⁰, extracción con un surfactante catiónico³², extracción líquida ultrasónica³⁹ y por QuEChERS.^{35,38}

Las técnicas instrumentales más utilizadas para identificar plaguicidas son por inyector de espacio de cabeza acoplado en un GC/MSD²⁸, cromatografía de gases^{31,33,34,37,40}, detección por espectrometría de masas de ionización por electropulverización de desorción neutra³⁶ y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).^{30,32,35,38,39}

Los métodos tradicionales como extracción líquido - líquido y SPE generalmente tienen procedimientos de múltiples etapas que requieren muestras grandes y varios pasos de extracción, por lo tanto, necesitan más tiempo, son más complicados, caros y producen cantidades considerables de residuos. Además, al contar con varias etapas aumentan la posibilidad de errores aleatorios.⁴¹

En el área forense se encuentran artículos que citan a la sangre como la matriz más común, extraída por SPE o por una simple extracción, utilizando para su identificación LC-MS-MS⁴², inyector de temperatura programada de grandes volúmenes acoplado a un

GC/MSD⁴³ o cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas con un micro detector de captura de electrones.⁴⁴

Sin embargo, no se encontraron referencias recientes de técnicas aplicadas en el área forense a matrices comúnmente recibidas en el DCF, como lo son las bebidas no alcohólicas y las bebidas alcohólicas, por esta razón el método a modificar es de importancia porque se podrá aplicar en bebidas. Además, la técnica QuEChERS es rápida, no se necesita gran cantidad de disolventes y ha demostrado excelentes resultados en la recuperación de los analitos del proyecto en matrices de agua, frutas y vegetales.^{13,41}

2.4. Método de extracción por QuEChERS

El método de extracción QuEChERS, por sus siglas en inglés: “Quick (rápido), “Easy (fácil), “Cheap” (barato), “Effective” (efectivo), “Robust” (robusto) y “Safe” (seguro), fue desarrollado por Anastasiades en el año 2003⁴⁵. A partir de este método se han derivado dos procedimientos oficiales, uno por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC)⁴⁶, y el otro por el Comité Europeo de Normalización (CEN).¹³

El método oficial realizado por el CEN consiste en su primera etapa de extracción, la adición a un tubo de 50 mL de al menos 10.0 g de la muestra (ya sea fruta o vegetal), se agrega agua necesaria según la cantidad de contenido de agua en la matriz hasta 10.0 mL y 10.0 mL de acetonitrilo con estándar interno. Para la segunda extracción y partición, se agrega una mezcla de sales que contiene sulfato de magnesio, cloruro de sodio y una mezcla amortiguadora de citrato y para la tercera etapa, el líquido se transfiere a un tubo de fase sólida dispersiva (d-SPE) que contiene una mezcla de resinas, con diferentes propiedades adsorbentes.¹³ Los materiales utilizados en los tubos d-SPE son⁴¹:

- Sulfato de magnesio anhidro: el $MgSO_4$ anhidro remueve el residuo de agua de la fase de acetonitrilo.
- Amina secundaria - primaria (PSA): resina de intercambio compuesta por sílicas modificadas con cadenas de *N*-etilaminopropilamina. Esta resina absorbe de la matriz ácidos orgánicos polares, pigmentos polares, algunos azúcares y ácidos grasos.
- Carbón negro grafitizado (GCB): elimina esteroides, pigmentos como la clorofila e interferencias no polares.

- Octadecil silicio (C18EC): gel de sílice modificado con cadenas de octadecilo. La EC del inglés “endcap” se refiere que la resina está libre de grupos silanol. Esta resina permite la eliminación de sustancias interferentes no polares como lípidos.

Por último, el líquido sobrenadante se aparta y se le agrega ácido fórmico al 5 %, siendo importante esta última etapa para plaguicidas lábiles en medio alcalino.

A pesar que el método QuEChERS fue desarrollado para el análisis multiresiduos de plaguicidas en alimentos, también se ha aplicado con modificaciones para la determinación de drogas ácidas, básicas y neutras en matrices biológicas^{41,47,48,49,50,51}, plaguicidas ácidos en madera⁴⁰ y lacrimógenos en prendas de vestir⁵² lo que demuestra que el método QuEChERS es versátil para su aplicación en otros analitos, y matrices mediante de la selección adecuada de sorbentes de d-SPE alternativos y de los diferentes niveles de concentración.

2.5. Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

Actualmente las técnicas analíticas más usadas para la identificación de plaguicidas organofosforados en diferentes matrices son cromatografía de alto rendimiento (HPLC) y cromatografía de gases (GC) acopladas a diferentes detectores como captura electrónica, selectivo de nitrógeno y fósforo, ionización de llama, masas o arreglo diodos.^{53,54,55,56,57}

La cromatografía se basa en un sistema de flujo que contiene dos fases, una móvil y otra estacionaria, en donde los componentes de la muestra son transportados a través de la fase estacionaria por el flujo de la fase móvil. La separación se logra mediante las diferencias de velocidad de migración entre las dos fases.^{58,59}

Existen dos tipos de métodos cromatográficos: la cromatografía plana y la cromatografía en columna, esta última dividida en tres categorías, según la naturaleza de la fase móvil: líquido, gas y fluido supercrítico.⁵⁹

La cromatografía de gases se basa en la evaporización de la muestra e inyección en una columna cromatográfica, lográndose la elusión mediante el uso de una fase móvil de gas inerte.⁶⁰ En la Figura 5 se puede observar las partes de un GC/MS.

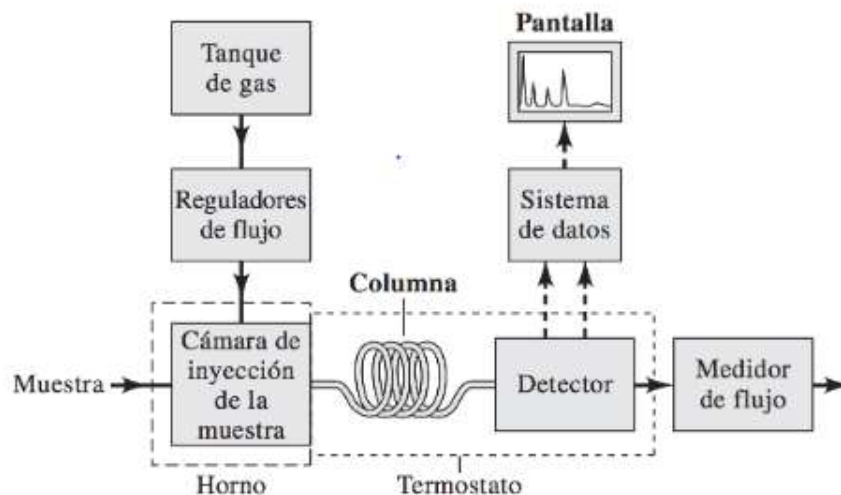


Figura 5. Diagrama de bloques de un cromatógrafo de gases típico.⁵⁹

Un cromatógrafo de gases se puede dividir en cuatro áreas: sistema de gas portador, sistema de inyección de muestras o autoinyector, columnas y hornos de columnas y el detector (ver figura 1).⁵⁹

2.5.1. Sistema de gas portador

Los gases de arrastre más utilizados son helio, argón, nitrógeno e hidrógeno y deben tener una pureza del 99.99 %. Estos deben ser inertes y estar libres de humedad y oxígeno ya que causan un aumento en el sangrado de la fase estacionaria, mala formación del pico cromatográfico y baja sensibilidad.^{61,62}

Para disminuir impurezas deben instalarse filtros en línea lo más cerca posible del instrumento y dependiendo del detector necesita requerimientos específicos, como lo son filtros de oxígeno cuando se utiliza detectores de espectrometría de masas. Además, se requieren reguladores de presión, calibradores y medidores de flujo para controlar la velocidad del flujo de gas.^{59,62}

2.5.2. Sistema de inyección de muestras y autoinyector

El inyector al tener que soportar diferentes presiones y temperaturas, debe ser elaborado con materiales de alta resistencia mecánica para evitar posibles fugas. Actualmente los cromatógrafos modernos cuentan con autoinyectores como se muestra en la siguiente figura, esto con el fin de lograr resultados más reproducibles.⁵⁹

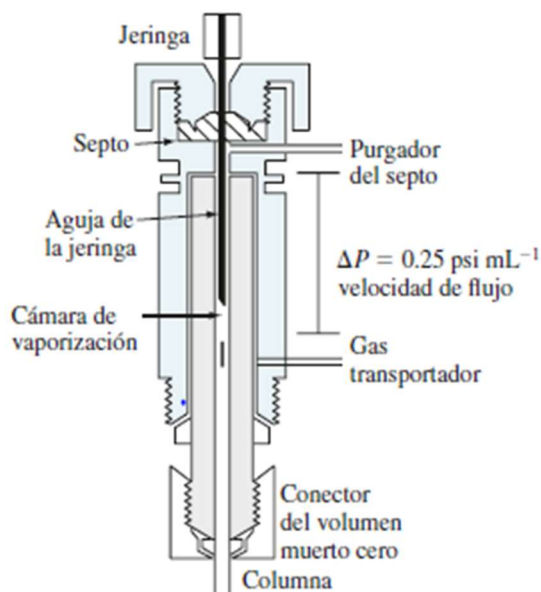


Figura 6. Inyector split/splitless, vista transversal.⁵⁹

El volumen de muestra a inyectar debe ser adecuado para que se garantice su volatilización en el puerto de inyección y una cromatografía eficiente, ya que una inyección lenta o de gran cantidad de muestra pueden producir ensanchamiento de bandas y deficiente resolución en la separación cromatográfica. El volumen de inyección y el tipo de disolvente es importante pues cada solvente produce diferentes volúmenes de vapor, pueden provocar un exceso en el volumen permitido por el liner, generándose “back flush”, en el cual el analito puede depositarse en las líneas del septum provocando resultados cuantitativos no reproducibles.^{59,62}

Para la inyección se utilizan microjeringas calibradas que introducen la muestra en el GC al atravesar un septum de caucho o silicona inerte en el puerto de inyección. Los volúmenes de inyección varían desde 0.1 μL con una jeringa de 10 μL hasta 200 μL con una jeringa de 200 μL . Este puerto de inyección se mantiene a unos 50 $^{\circ}\text{C}$ por encima del punto de ebullición del componente menos volátil de la muestra.⁵⁹

El septum que se encuentra en la parte superior del liner puede presentar fugas generando cambios en la línea base, problemas de presión y poca reproducibilidad cuantitativa, por estas razones es importante verificar que esté bien colocado, no perforado de forma excesiva y de ser necesario cambiarlo. Además, se debe corroborar que el flujo de purga del septum sea el adecuado para disminuir la presencia de picos fantasmas por contaminación.^{59,62}

El modo de inyección de las muestras puede ser directo “on column”, con inyectores programados de vaporizador de temperatura (PTV) o de tipo “split/splitless”. Para

muestras sucias como lo son las bebidas y otros tipos de matrices comunes recolectadas como indicio en una escena forense son mejores las técnicas de inyección de vaporización, siendo el modo “splitless” el más utilizado, aunque presenta ciertos problemas como adsorción, termodegradación y no es ideal para compuestos de baja volatilidad. Para minimizar estos problemas se aplica una presión pulsada ayudando también a la sensibilidad de detección.^{63,64}

Para inyectores de tipo “splitless” la purga debe realizarse alrededor de 20 segundos después de la inyección, ya que si se realiza muy pronto se puede perder parte de la muestra resultando en una mala cuantificación, pero si se deja más tiempo puede generar coleo del disolvente con un aumento de la línea base.^{62,65}

El liner usado debe ser acorde con el modo de inyección. La superficie del liner fabricada de vidrio de cuarzo y la lana de vidrio están sililadas e inertes, en otras palabras, inactivas. Si las muestras están muy sucias y se utilizan reactivos derivatizantes el liner se ensucia lo que puede generar coleo en los analitos. Para evitar estos problemas o cuando se ha utilizado muchas veces y pueda estar sucio por el tipo de muestras inyectadas, es importante cambiarlo.⁶²

2.5.3. Columnas y hornos

Por lo general se utilizan dos tipos de columnas para la cromatografía de gases: las columnas empaquetadas, siendo el tamaño de muestra desde unas décimas de microlitros hasta 20 μL , y las columnas tubulares abiertas o capilares que requieren muestras menores a un factor de 100 o más, esta última es comúnmente usada en la actualidad por ser más rápida y eficiente. Son fabricadas de acero inoxidable, sílice fundida o teflón con una longitud de entre 2 m hasta 50 m y enrolladas en serpentines con diámetros del embobinado de 10 cm a 30 cm para que puedan entrar en los hornos con termostato.⁵⁹

La temperatura aplicada a las columnas es un factor muy importante y debe controlarse minuciosamente, esta depende del punto de ebullición de las muestras y del grado de separación necesario. Si se emplea una mínima temperatura, siendo igual o un poco más alto que el punto de ebullición de las muestras, implica una duración razonable, pero con un mayor tiempo de elución y por ende de análisis. Para las muestras con un intervalo de ebullición amplio, es recomendable un programa de temperaturas, con el que se incrementa de forma continua o escalonada, permitiendo una mejor separación de los picos cromatográficos de los analitos.⁵⁹

Un problema que se puede presentar por usar el modo “splitless” es la forma de los picos, que se relaciona con la homogeneidad de la muestra cuando entra a la columna, para esto es importante que la polaridad del disolvente coincida con la polaridad de la fase estacionaria. Además, la temperatura inicial del horno debe ser al menos 10 °C por debajo del punto de ebullición del disolvente, esto para condensar los analitos en la entrada de la columna y que se revolatilicen cuando la temperatura del horno vaya aumentando con el fin de obtener picos agudos en el cromatograma.⁶⁵

2.5.4. Detectores

Dentro de los detectores más comunes están el de captura electrónica, conductividad térmica, espectrometría de masas e ionización de llama. Un detector ideal debe cumplir ciertas características como buena sensibilidad, tiempo de respuesta rápida, buena estabilidad y reproducibilidad, entre otros. Uno de los detectores más usados en la actualidad es el espectrómetro de masas, el cual mide la relación masa-carga (m/z) de iones que se forman a partir de la muestra inyectada y separada. Este detector escanea repetidamente las masas de los fragmentos que se forman de los componentes. Las partes más importantes de un detector de masas se observan en la Figura 7. Este detector además de permitir realizar análisis cualitativo y cuantitativo mejora en mucho la especificidad de la determinación al indicar si un pico cromatográfico corresponde a más de una sustancia y permitir identificar diversos componentes sin resolver.⁵⁹

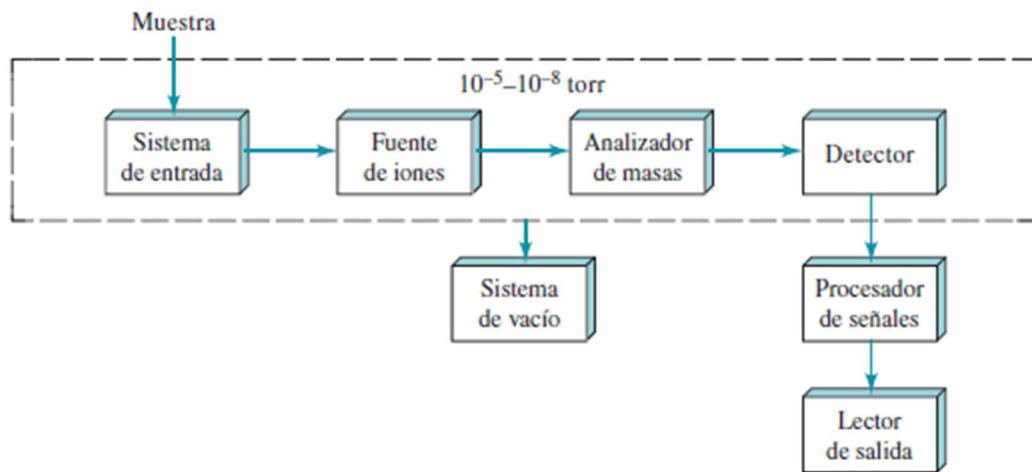


Figura 7. Diagrama de bloques de los componentes de un espectrómetro de masas.⁵⁹

Los espectrómetros de masas necesitan un sistema de alto vacío complejo (recuadro de línea de puntos) para mantener una baja presión en la mayoría de los componentes, esto con el fin de que haya una frecuencia de colisión relativamente baja entre las especies químicas de interés analítico. El sistema de entrada solo deja introducir una pequeña cantidad de la muestra a la fuente de iones, por eso con el uso de columnas empacadas

era necesario disminuir el volumen del gas de arrastre con separadores y membranas, pero al usar columnas capilares, como la cantidad en columna es mucho mejor, con una velocidad de flujo baja puede entrar directamente a la cámara de ionización del detector toda la muestra cromatografiada sin necesidad de un dispositivo divisor adicional.⁵⁹

Una vez la muestra se encuentra en la fuente de iones y dependiendo del tipo de fuente, esta se convierte en fragmentos iónicos gaseosos por medio del bombardeo de iones, fotones, electrones o moléculas. Las fuentes más comunes son de impacto electrónico y de ionización química, siendo la primera la más utilizada. En la fuente de impacto de electrones, las moléculas son bombardeadas con un haz de electrones de alta energía produciendo iones positivos, negativos y especies neutras. Los iones positivos son dirigidos por repulsión electrostática al analizador.⁵⁹

Los analizadores de masas separan los iones según los valores de masa-carga. Dentro de los más utilizados están el analizador cuadrupolar y el de trampa de iones. El analizador de masa de cuadrupolo consiste en un sistema que combina la aplicación de un campo magnético y una radiofrecuencia que permite el paso selectivo de ciertos iones en el tiempo a partir de la interacción de su relación masa-carga con las barras del analizador. Este analizador consiste en cuatro cilindros, como se observa en la Figura 8.⁵⁹

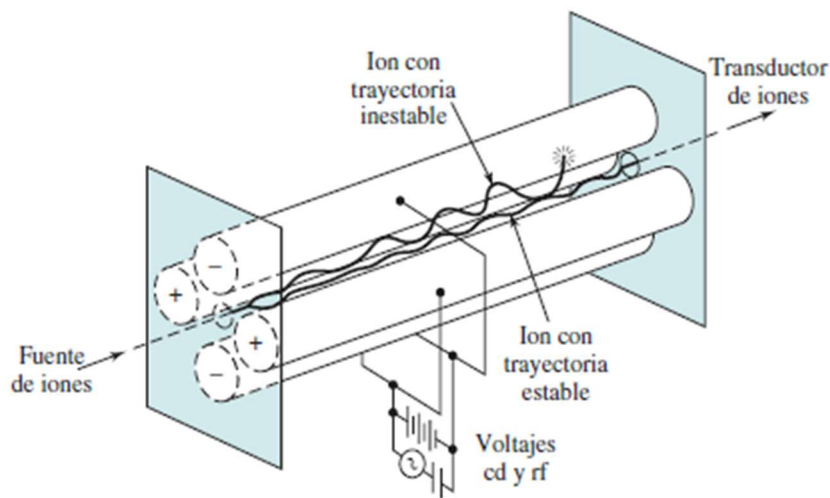


Figura 8. Diagrama de un analizador de masa tipo cuadrupolar.⁵⁹

Los analizadores cuadrupolares tienen un rendimiento muy alto, gran reproducibilidad, pero con una resolución relativamente baja para la separación de iones por su relación m/z de 1 m/z , sin embargo, esta resolución es suficiente si se acopla con un cromatógrafo de gases como técnica de separación.⁵⁹

Para procesar los datos se utiliza un sistema computarizado y pueden ser analizados por: la suma de la abundancia de los iones en cada espectro, graficados en función del tiempo para obtener un cromatograma iónico total (TIC, siglas en inglés), un espectro de masas en un tiempo determinado para identificar las sustancias que eluyen en ese tiempo o se puede seleccionar y monitorear un único valor de masa-carga durante la corrida cromatográfica, conocido como monitoreo selectivo de iones (SIM, siglas en inglés) si la filtración se realiza desde la adquisición en el analizador o por cromatograma de ión extraído (IEC), si la filtración se realiza sobre la adquisición en SCAN. La adquisición en SIM es la más sensible.⁵⁹

2.6. Estándar interno

Para una mayor precisión de la señal analítica en los métodos cuantitativos en cromatografía de gases es indispensable utilizar al menos un estándar interno, el cual minimiza las fluctuaciones instrumentales, inestabilidades y efectos de la matriz. En el caso de los métodos cualitativos el estándar interno permite mejorar el criterio de identificación del tiempo de retención y servir de control.⁵⁹

El uso del estándar interno consiste en la adición de una misma cantidad conocida de esta sustancia tanto a las curvas de calibración como a las muestras o a los extractos de las muestras y a los blancos, en donde los resultados se muestran como una relación entre el área del pico del analito y el área del pico del estándar. Un buen estándar interno debe estar ausente de la matriz analizada, observarse en los cromatogramas resuelto de los diferentes componentes de la muestra y cerca de los picos de los analitos. Además, debe ser químicamente estable y mostrar un comportamiento similar a los analitos evaluados.^{59, 66}

Existen diferentes tipos de estándar interno dependiendo de la etapa del análisis donde son adicionados:

1. Estándar interno de extracción: que es agregado al comienzo del método de extracción para tomar en cuenta las diversas fuentes de errores en las etapas del método de extracción.⁶⁶
2. Estándar interno de inyección o instrumental: que es agregado a los extractos finales justo antes de inyectarse al equipo, esto para tomar en cuenta las variaciones que presenta el equipo.⁶⁶
3. Estándar interno agregado es una etapa diferente: a las mencionadas anteriormente, esto para corregir errores en una etapa específica del método. Por

ejemplo, un estándar interno para garantizar que una etapa de derivatización de los analitos se llevó a cabo.⁶⁶

Idealmente cuando se usa espectrometría de masas en métodos cuantitativos se recomienda utilizar un estándar interno que es el análisis isotópico polideuterado de cada analito. Este estándar interno presenta la misma estructura química del analito evaluado con únicamente una masa diferente. Este tipo de estándar interno son costosos y permiten compensar las fluctuaciones en el analito por el procedimiento, el efecto matriz, variaciones en el equipo instrumental desde la inyección hasta la detección e inclusive pérdidas por el almacenamiento de los extractos.⁶⁶

2.7. *Análisis cualitativo en química forense*

El término forense se refiere a la aplicación de la ley en el sistema judicial por esto la química forense existe donde la ciencia y la ley se traslapan, siendo ésta la aplicación de la química analítica a los propósitos de la ley. Esta ciencia aplicada se divide en tres áreas: cualitativa, cuantitativa y comparativa. Esta última utiliza mediciones cualitativas y cuantitativas para establecer el origen de una muestra. El análisis cualitativo en química forense es muy importante por sí solo, ya que responde a las preguntas que plantea la ley vigente por medio de la investigación criminal, siendo la encargada de demostrar el delito a partir de las actividades realizadas con la sustancia identificada. Caso contrario es la Toxicología Forense, en la que la cuantificación en sangre de la sustancia identificada es importante para establecer un nivel de intoxicación determinado o asociarlo con un patrón conductual en el momento que ocurrieron los hechos.⁶⁷

El presente proyecto de graduación aplica un análisis cualitativo porque su objetivo es responder a la ley si el plaguicida se encontraba en la muestra y no es de intereses su concentración ya que no se sabe cuánto ingirió la persona. Además, no es importante el análisis de trazas de plaguicidas sino un plaguicida adicionado.

En Química Forense para la debida identificación de una sustancia química ya sea con fines cualitativos o cuantitativos, no es permitido la aplicación de una sola técnica analítica, se requiere de un esquema analítico (combinación de técnicas) adecuado basado en métodos validados que en conjunto garanticen la identificación inequívoca de la sustancia, para poder evitar tanto los falsos positivos como los falsos negativos. En la validación se debe incluir este aspecto y reportar el alcance y las limitaciones de la aplicación del esquema validado.¹⁴

En la comunidad científica forense los esquemas analíticos cualitativos recomendados difieren de acuerdo con el área de aplicación y el tipo de analitos:

- Identificación de analitos orgánicos semivolátiles de peso molecular medio (aproximadamente entre 100 m/z a 650 m/z): está basado en los criterios de WADA TD2021DCR y OSAC 2002, enfocados en el área del control de dopaje y toxicología forense. El cual consiste en un esquema acoplado de las técnicas GC y MSD ó LC y MSD con la evaluación independiente del tiempo de retención y la intensidad relativa de tres iones calificadores en el caso de GC o dos iones calificadores en el caso de LC contra un material de referencia medido en la misma secuencia.^{15,16} Este esquema recomienda el análisis de las muestras por duplicado como un control de contaminación cruzada.
- Identificación de analitos por la aplicación de técnicas de categoría A, según SWGDRUG: está basado en los criterios de SWGDRUG 2019, enfocado en el área de química forense de sustancias puras, específicamente drogas de decomiso. Consiste en la medición de una técnica de categoría A que provee información estructural y otra independiente de categoría A, B o C contra un material de referencia. SWGDRUG permite que en ausencia de técnicas A se puede utilizar dos técnicas B (dos cromatografías) con principio de separación diferentes y una técnica adicional B o C.¹⁴
- Identificación de analitos donde la aplicación de técnicas de categoría A, según SWGDRUG, no es posible: está basado en los criterios de TWGFEX, enfocado en el área de detección forense de explosivos intactos. Consiste en la medición de una técnica de categoría 2, según TWGFEX, y otra técnica independiente.⁶⁸
- Identificación de analitos volátiles de bajo peso molecular: está basado en los criterios de GTFCH 2011, enfocado en el área de alcohol en sangre. Consiste en la medición independiente en dos columnas cromatográficas de polaridad diferente por GC/FID.⁶⁹

La clasificación de técnicas A, B o C, por SWGDRUG se muestra en el Cuadro II. SWGDRUG recomienda los estándares mínimos para el análisis cualitativo de una droga incautada, mediante un esquema de combinación métodos analíticos validados.¹⁴ Este esquema clasifica las técnicas para análisis en tres categorías según su potencial de discriminación: (A) para las técnicas con mayor poder discriminante, (B) para las técnicas de poder discriminante intermedio y (C) para las técnicas con bajo poder discriminante (Cuadro II). Para TWGFEX una técnica clase 1 y 2 es equivalente a una técnica A de SWGDRUG y una técnica de clase 3 es equivalente a una técnica B de SWGDRUG.⁶⁸

Cuadro II. Clasificación de las técnicas analíticas cualitativas de acuerdo con su poder discriminante*

Categoría A	Categoría B	Categoría C
Espectroscopía infrarroja	Electroforesis capilar	Pruebas de color
Espectrometría de masas	Cromatografía de gases	Espectroscopía fluorescente
Espectroscopía por resonancia magnética nuclear	Espectrometría de movilidad iónica	Inmunoensayo
Espectroscopía Raman	Cromatografía líquida	Punto de fusión
Difractometría de rayos X	Pruebas microcristalinas	Espectroscopía ultravioleta
	Identificadores farmacéuticos	

(*) Modificado de SWGDRUD, versión 8, 2019.¹⁴

A continuación, se enumeran los criterios de identificación que recomienda SWGDRUG¹⁴:

- Cuando se incorpore en el esquema analítico una técnica de categoría A validada, debe utilizarse al menos otra técnica de categoría A, B o C. (Criterio IIIB.3.1).
- Los criterios de aceptación de cada técnica deben ser definidos en la validación del método y en el procedimiento (Criterio IIIB.3.5).
- En el caso de técnicas acopladas, como es el caso de GC/MSD, se consideran como técnicas separadas, de tal forma que analicen de forma independiente los resultados de cada una, es decir para el caso de GC/MSD, serían el tiempo de retención y la información espectral (Criterio IIIB.3.5)

Los criterios para la determinación cualitativa o la caracterización por medio de un espectro se han definido tradicionalmente por comparación con bases de datos. La forma más simple de comparación espectral entre un material de referencia y el analito de una muestra cuestionada es la sobreposición de las dos impresiones y su visualización en una caja de luz. De esta forma se observa la sobreposición de ambos espectros. Esta es la forma de identificación que se plantea en la farmacopea británica.⁷⁰

Curry⁷¹ en 1969, e Ingle y Mathieson⁷² en 1976, plantearon un sistema de identificación por el espectro infrarrojo, según el cual una sustancia puede ser identificada por comparación con una base de datos, con cierto nivel de confianza, por comparación de las seis bandas de mayor absorción en la región de la huella digital. Este sistema

involucra la comparación con compendios impresos de espectros infrarrojos y el uso de índices también impresos que facilitan la búsqueda.

Anthony Moffat⁷⁰ incluye en sus monografías para cada sustancia pura una imagen de los espectros ultravioleta, infrarrojo por transmisión y el espectro de relación masa/carga por impacto electrónico, indicando las bandas o iones principales bajo condiciones específicas. Además, incluyen la descripción de las coloraciones que genera cada sustancia al ser evaluada en pruebas a la gota clásicas como Marquis, entre otras. Estas formas también constituyen un sistema de identificación.¹⁴

Las bases de datos digitales comerciales de espectros de masas generadas por impacto electrónico hoy son las más comunes y son usadas en conjunto con análisis por GC/MSD-EI. En el mercado, las bibliotecas más comunes son las del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) y el Registro de datos espectrales de masas de Wiley. Estas usan el pico base para comparar el espectro de masas de una sustancia desconocida, tomando en cuenta los valores de masa/carga y las intensidades de los iones. De acuerdo con Anthony Moffat⁷⁰, un buen valor de comparación contra una base de datos se encuentra entre el 90 % y el 100 %, y un mal valor está por debajo del 60 %.

Sin duda las mejores bases espectrales comerciales de comparación son las de masas exactas, pero estas requieren de utilizar analizadores de masas de alta resolución tipo Orbitrap® o tiempo de vuelo (TOF) que son sumamente costosos.

El objetivo de una buena identificación es lograr identificar selectivamente una sustancia entre aquellas sustancias que tendrían tiempos de retención y espectros de relación m/z semejantes. El análisis cualitativo por comparación de espectros de relación m/z por impacto electrónico de un analito desconocido contra bibliotecas comerciales o propias del laboratorio puede generar falsos negativos o falsos positivos bajo ciertas circunstancias como las siguientes:

- Concentraciones muy bajas del analito que pueden afectar las intensidades relativas de bandas de baja intensidad al encontrarse cerca del ruido instrumental.⁹
- Concentraciones altas del analito que pueden saturar la fuente de ionización y aumentar la intensidad relativa de los iones de intensidad media y baja.⁹
- La diferente configuración de la adquisición en SCAN genera espectros de relación m/z diferentes, e inclusive la misma configuración y entre equipos de un mismo fabricante se pueden obtener espectros diferentes.⁹

- No menos importantes son la presencia de contaminantes en el espectro producto de coeluciones y sangrado.⁷³

La Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNDOC) recomienda la identificación, comparando el tiempo de retención y el espectro de masas de la sustancia analizada con los de un material de referencia reciente, obtenido con el mismo instrumento y en las mismas condiciones, mencionando que las bibliotecas solo se deben utilizar con fines de referencia.⁷⁴ WADA recomienda que el material de referencia debe ser medido en el mismo lote de muestras.¹⁵

WADA define criterios mínimos para la confirmación de la identidad de analitos por GC/MSD. Establece criterios para el tiempo de retención, indicando que el pico cromatográfico de la muestra no debe diferir del material de referencia en más del 1 % para tiempos de retención mayores a los 10 min y ± 0.1 min para tiempos de retención menores a los 10 min. En caso de utilizar el tiempo de retención relativo que no difiera en más del 1 %. Los criterios para la evaluación del espectro de relación m/z se basan en la comparación de la intensidad relativa al pico base de solamente tres iones calificadores seleccionados en la validación de la metodología (Cuadro III)¹⁵.

Cuadro III. Ámbitos de tolerancia máximos para la abundancia relativa de los iones.

Abundancia relativa de los iones en el material de referencia	Ámbitos de tolerancia máximos para la abundancia relativa de los iones en la muestra analizada	Ejemplos	
		Abundancia relativa	Ventana de tolerancia
50 % - 100 %	± 10 (absoluto)	60	50 – 70
25 % - 50 %	± 20 (relativo)	40	32 – 48
1 % - 25 %	± 5 (absoluto)	10	5 - 15

*Modificado de WADA, informe técnico TD2021IDCR, 2021.*¹⁵

Las abundancias relativas de los iones diagnósticos comparados con los del material de referencia o con los de una matriz enriquecida con estos no deben diferir por más de lo especificado en el Cuadro III. La relación señal/ruido (S/N) de dichos iones debe ser mayor de tres.¹⁵

En el caso de OSAC indica que siempre se debe utilizar al menos una técnica cromatográfica, con criterios de aceptación cromatográfica que deben incluir: forma de pico, tiempo de retención, resolución, y relación señal/ruido. Además, OSAC establece una tabla de asignación de puntajes por técnica independiente que debe sumar un valor de 4. En el caso del análisis del tiempo de retención por GC suma 1 punto y el análisis de la intensidad relativa de cada fragmento por impacto electrónico sumaría 1 punto cada

uno. Por lo tanto, la técnica GC/MSD a emplear en este trabajo estaría sumando 4 puntos que es el parámetro ideal establecido por OSAC.¹⁶

Por lo tanto, los criterios de identificación definidos para ser utilizados en esta investigación es la selección de la técnica GC/MSD acoplada como técnica B y A según lo establece SWGDRUG y de 4 puntos como lo establece OSAC; el análisis independiente del tiempo de retención y de las intensidades relativas de tres iones calificadores como lo establece WADA. Sumado a lo anterior la evaluación de la forma de pico y resolución como lo establece OSAC.¹⁶

2.8. Criterios Horwitz y Westgard en la evaluación de metodologías cuantitativas que involucran extracción

La recuperación es una forma de expresar la veracidad de un método, en especial cuando incluye etapas de extracción donde puede alterarse la cantidad de analito en una muestra.⁷⁵ Ésta se realiza mediante la comparación de resultados analíticos de la muestra extraída contra el material de referencia, el cual debe ser estable, preciso y reproducible.⁷⁶

El desempeño de la recuperación se puede evaluar mediante varias formas, sin embargo, en este proyecto se propone utilizar criterios de Horwitz⁷⁷ y los criterios de Westgard.⁷⁸ Horwitz plantea que el comportamiento de dispersión de los resultados se puede presentar mediante un gráfico del coeficiente de variación (CV) expresado en potencia de 2 contra la concentración medida expresada en potencia de 10. La relación de Horwitz o Horrat se calcula con la siguiente ecuación.⁷⁷

$$\text{Horrat} = \frac{\text{SR}}{\sigma\text{H}}$$

SR: desviación estándar relativa expresada en porcentaje

σH : desviación estándar pronosticada por el CV de Horwitz

Ecuación 1. Ecuación de Horwitz o Horrat para la evaluación de la dispersión de los resultados.

El valor óptimo mediante esta relación es de 1 con límites aceptables entre 0.5 y 2. Sin embargo, un valor bajo, puede ser obtenido por promedios no reportados o por una muy baja SR que podría deberse a un analista con mucha experiencia cuyas desviaciones son muy bajas, mientras que valores mayores a 2 pueden indicar no homogeneidad de las muestras, necesidad de optimizar el método o un método no satisfactorio.⁷⁹

Dentro de las herramientas básicas para la evaluación de métodos, se encuentra también el criterio de Westgard, que permite evaluar los errores sistemáticos y aleatorios del rendimiento de un método.⁷⁸ Esta herramienta consiste en la elaboración de una gráfica con el porcentaje de sesgo o error total (TE) en el eje de las ordenadas y el coeficiente de variación o imprecisión en el eje de las abscisas. Por ejemplo, en la gráfica se trazan cinco líneas entre el máximo del porcentaje de sesgo tolerable (10 %) y el coeficiente de variación teórico, el cual se obtiene al multiplicar el error total por factores de 0.17; 0.20; 0.25; 0.33 y 0.50, siendo este último factor el 50 % del requisito de la calidad. Los resultados obtenidos de la metodología a evaluar se grafican por medio de puntos en las zonas definidas dentro del gráfico. Estas zonas clasifican el rendimiento de la metodología en inaceptable, pobre, marginal, bueno, excelente y clase mundial como se observa en la Figura 9.⁷⁸

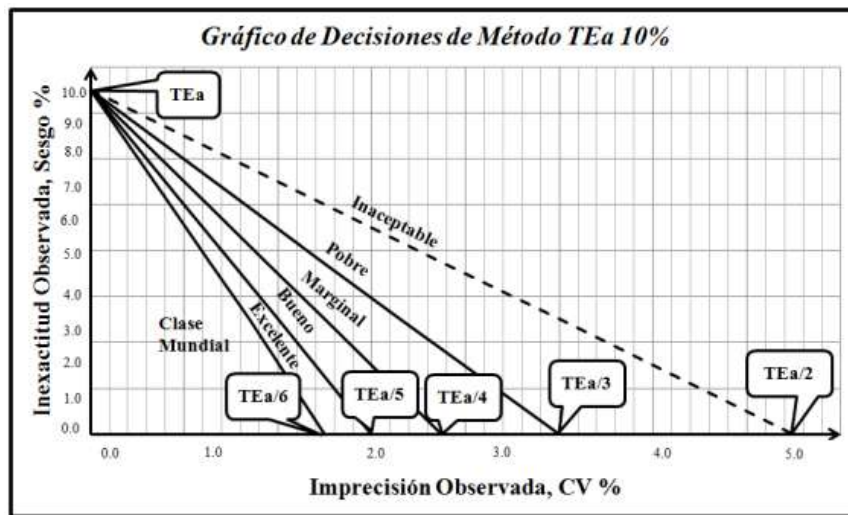


Figura 9. Representación gráfica de Westgard.⁷⁸

2.9. Validación de métodos cualitativos

Cuando se aplica un método analítico a muestras reales, tanto la confianza en los resultados como el rendimiento de extracción y de los instrumentos deben ser evaluados. Por esta razón es que los métodos analíticos se validan, siendo esta la confirmación mediante diferentes pruebas y evidencia objetiva de que se cumplen con los requisitos que se quieren obtener para ese método específico.^{59,66}

Existen varias formas de validar un método, dentro de las cuales están el análisis de materiales estándar de referencia, análisis por un método analítico distinto y análisis de muestras sintéticas que tienen similar composición química a las muestras evaluadas.⁵⁹

La validación en esta investigación debe verificar la capacidad del método para identificar los analitos de acuerdo con el alcance planteado originalmente para el método, esto se logra mediante la evaluación de diferentes parámetros mencionados en los lineamientos definidos por el DCF, los cuales incluyen:

- Evaluación de parámetros instrumentales: a la hora de validar un método nuevo se debe garantizar la resolución y una forma similar a la campana Gaussiana de los picos cromatográficos de los analitos, todo esto sin generar efecto memoria.⁵⁹
- Selección de iones principales: para la identificación por medio del espectrofotómetro de masas se realiza, eligiendo los iones principales de cada analito.¹⁵
- Calibración dinámica: es importante para seleccionar el ión calificador con la carga más intensa.⁸⁰
- Estabilidad de la disolución de los analitos: la estabilidad de los plaguicidas de los plaguicidas depende de la temperatura de almacenamiento, de la cantidad de luz y del disolvente utilizado. Según estudios si se almacenan correctamente pueden ser estables durante años en disolventes orgánicos como tolueno, acetato de etilo, acetona o acetonitrilo.⁶⁶
- Selectividad: la selectividad es la capacidad del método de extracción de limpiar las muestras para que el detector distinga el analito de otros compuestos.⁶⁶
- Límite de detección: es la menor concentración en la que un analito puede ser detectado.⁵⁹ En el caso de un GC/MSD de baja resolución con impacto electrónico, una técnica conveniente para su determinación es por ajuste de calibración descrita por Miller y Miller⁸⁶, la cual se realiza mediante curvas de calibración de los estándares de referencia en disolventes o en muestras reales.⁵⁹
- Linealidad y ámbito para la determinación cualitativa: el ámbito lineal es un intervalo de concentraciones donde el analito puede ser determinado utilizando una curva de calibración, en la cual también se puede comprobar la linealidad.⁵⁹
- Precisión: es la reproducibilidad del resultado de varias mediciones independientes siguiendo el procedimiento.⁶⁶
- Efecto memoria: para desactivar el sistema de GC/MSD y maximizar la detección del analito se inyecta grandes cantidades de este al equipo, sin embargo, es importante que en el disolvente o en el blanco con extracto después de esa inyección no presente efecto memoria en otras palabras, que esté ausente el

analito.⁶⁶ Este efecto también puede ocurrir en muestras con altas concentraciones de los analitos.

- Estabilidad del extracto: condiciones como la temperatura, tiempo, pH y entre otros pueden afectar la estabilidad del analito en el extracto, por lo cual los extractos deben ser evaluados tanto refrigerándolos donde se minimiza la degradación de estos como en el automuestreador del equipo donde la temperatura es más alta.⁶⁶
- Recuperación: es la cantidad de analito que se recupera después de su extracción por medio de un método analítico.⁶⁶
- Exactitud: es la concordancia entre un resultado analítico y el verdadero valor o un valor de referencia aceptado.⁵⁹
- Robustez: es la capacidad de un método analítico para no ser afectado por pequeñas pero intencionadas variaciones que proporcionan confiabilidad como volumen, velocidad de la centrifuga, etc.⁸¹
- Rugosidad: es la capacidad de un método analítico para no verse afectado por variaciones no controladas como diferentes analistas, columnas, etc.⁸¹

Capítulo 3. Objetivos

3.1. *Objetivo general*

Modificar y validar un método multicomponentes para el análisis cualitativo de forato, malatión, etoprofós, clorpirifós, diazinón y metilparatión, en jugo de manzana y cerveza, mediante una modificación de la técnica de extracción QuEChERS EN15662:2008 seguida de detección por GC/MSD-EI.

3.2. *Objetivos específicos*

Establecer los parámetros de desempeño instrumentales para una metodología por GC/MSD-EI para la separación y la caracterización de forato, malatión, etoprofós, clorpirifós, diazinón y metilparatión.

Analizar los parámetros de desempeño de una modificación del método QuEChERS EN15662:2008 para la extracción y la limpieza de forato, malatión, etoprofós, clorpirifós, diazinón y metilparatión, en una matriz de jugo de manzana y una matriz de cerveza.

Categorizar el desempeño de la metodología modificada, al ser aplicada a matrices diferentes de cervezas, jugos de manzana y cerveza dopada con diferentes concentraciones de etanol de acuerdo con los criterios de Horwitz y a los criterios de Westgard.

Capítulo 4. Metodología

4.1. Reactivos y materiales

El agua desionizada tipo II utilizada fue preparada en el Departamento de Ciencias Forenses con un equipo de marca Milli-Q®, modelo Integral 10. Los disolventes utilizados acetoneitrilo y tolueno fueron grado cromatográfico marca Fluka Analytical y Sigma Aldrich, respectivamente.

Se utilizaron paquetes de extracción preparados para QuEChERS y los kit de extracción en fase sólida dispersiva son marca Agilent Technologies. El helio utilizado como gas de arrastre en el cromatógrafo fue grado UAP, comprado a la compañía Linde.

Se utilizó micropipetas de marca Eppendorf y la cristalería volumétrica utilizada fue de clase A.

Además, se utilizó un vortex de marca Oxford, modelo BenchMate VM-MT, una centrífuga marca Hettich, modelo Universal 320R, una microcentrífuga marca Eppendorf, modelo 5415 D, un ultra turrax de marca Ika, modelo T 18 D, una balanza analítica de marca Mettler Toledo, modelo XS205 y una balanza granataria de marca Ohaus, modelo Adventurer Pro (menor división 0.01 g).

Los equipos fueron facilitados por el Departamento de Ciencias Forenses.

Los materiales de referencia utilizados son marca Supelco, grado estándar analítico.

4.2. Matrices utilizadas en la validación

Las diferentes muestras de cervezas utilizadas para la validación se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro IV. Información de las diferentes marcas de cervezas utilizadas en la validación.

Muestra de cerveza utilizada para el desarrollo de la metodología	
Código de identificación	Descripción
A	fabricada en Costa Rica, tipo lager con un contenido alcohólico de 4.5 mL/100 mL
Muestra de cerveza utilizada para la evaluación del efecto del etanol	
Código de identificación	Descripción
B	fabricada en Costa Rica, tipo lager libre de alcohol
Muestras de cervezas utilizadas para la evaluación del desempeño de la metodología	
Código de identificación	Descripción

C	fabricada en Nicaragua, tipo lager internacional con un contenido alcohólico de 4.6 mL/100 mL
D	fabricada en Holanda, tipo lager internacional con un contenido alcohólico de 5.0 mL/100 mL
E	fabricada en Alemania, tipo lager internacional con un contenido alcohólico de 4.3 mL/100 mL
F	fabricada en Holanda, tipo strong lager con un contenido alcohólico de 8.5 mL/100 mL
G	fabricada en Costa Rica, tipo dunkel con un contenido alcohólico de 5.0 mL/100 mL
H	fabricada en Irlanda, tipo stout con un contenido alcohólico de 4.2 mL/100 mL

En el mercado se pueden encontrar muchas marcas de cerveza por lo que se tomó en cuenta ciertas características a la hora de elegir las: las cervezas tipo lager internacional con un contenido alcohólico de 4.6 mL/100 mL y con un contenido alcohólico de 5.0 mL/100 mL se escogieron por ser de alto consumo, la de tipo lager internacional con un contenido alcohólico de 4.3 mL/100 mL por ser barata, las de tipo dunkel con un contenido alcohólico de 5.0 mL/100 mL y tipo stout con un contenido alcohólico de 4.2 mL/100 mL por ser cervezas de tono oscuro y la de tipo strong lager con un contenido alcohólico de 8.5 mL/100 mL por contener un alto porcentaje de alcohol.

Las diferentes muestras de jugo de manzana utilizadas para la validación se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro V. Información de las diferentes marcas de jugo de manzana utilizadas en la validación.

Muestra de jugo de manzana utilizada para el desarrollo de la metodología	
Código de identificación	Descripción
A	fabricada en Costa Rica, sin adición de azúcar, con 11 g/100 mL de carbohidratos totales
Muestras de jugos de manzana utilizadas para la evaluación del desempeño de la metodología	
Código de identificación	Descripción
B	néctar de manzana, fabricado en Costa Rica, con 13.0 g/100 mL de carbohidratos totales
C	néctar de manzana, fabricado en Guatemala, con 17.0 g/100 mL de carbohidratos totales
D	bebida de soya con jugo de manzana, fabricado en México, con 4.5 g/100 mL de carbohidratos totales y con 0.60 g/100 mL de proteína de soya
E	agua saborizada con jugo de manzana, fabricado en Costa Rica, con 0.50 g/100 mL de carbohidratos totales
F	refresco con jugo de manzana, fabricado en Costa Rica, con 11.6 g/100 mL de carbohidratos totales

G	néctar de manzana, fabricado en Guatemala, con 12.4 g/100 mL de carbohidratos totales
---	---

El mercado de los jugos de manzana no es tan variado como lo es el de cerveza, por esta razón fue más sencillo seleccionar las marcas. Dentro de sus diferencias es que las que contenían 13 g/100 mL de carbohidratos totales, 17 g/100ml de carbohidratos totales y con 12.4 g/100 mL de carbohidratos totales son néctares, la que contenía 0.50 g/100 mL de carbohidratos totales fue agua saborizada con jugo de manzana, con 11.6 g/100 mL de carbohidratos totales fue refresco con jugo de manzana y con 4.5 g/100 mL de carbohidratos totales fue un líquido de soya con jugo de manzana.

Todas las bebidas utilizadas, fueron compradas en un negocio local de Alajuela. El contenido alcohólico de todas las cervezas se midió como una colaboración en la Sección de Toxicología del Departamento de Ciencias Forenses por una metodología por espacio de cabeza con un cromatógrafo GC/FID de doble columna de marca Agilent Technologies modelo 6890, validada para la determinación cuantitativa de alcohol en sangre. El contenido de carbohidratos totales de las bebidas con manzana jugos de naranja se toma de la tabla nutricional reportada por el fabricante.

Se corroboró que las bebidas no contenían plaguicidas en niveles superiores al LD por aplicación de un control negativo.

4.3. Materiales de referencia

Los materiales de referencia de los plaguicidas y los estándares internos fueron adquiridos por el Departamento de Ciencias Forense, mayoritariamente a la compañía Sigma Aldrich. Todos ellos son grado estándar analítico de las sustancias: clorpirifós, diazinón, etoprofós, forato, malatión, metilparatión, antraceno y trifenilfosfato. El tetrafeniletileno es grado reactivo.

Las disoluciones madre de los plaguicidas se prepararon a una concentración de 2.00 mg/mL en acetonitrilo, midiendo una masa equivalente de 50.0 mg del analito en balones aforados de 25.00 mL. A partir de las disoluciones madre se prepararon las disoluciones intermedias en mezcla a 50.0 mg/L para cada analito. Tanto las disoluciones madre como las disoluciones intermedias se almacenaron en viales silanizados ámbar en congelación a $(-18 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

Las disoluciones madre de los estándares internos se prepararon a una concentración de 2.00 mg/mL en tolueno, midiendo una masa equivalente de 50.0 mg del analito en balones aforados de 25.00 mL. A partir de las disoluciones madre se prepararon las

disoluciones intermedias individuales en acetonitrilo para antraceno, tetrafeniletieno y trifenilfosfato a una concentración de 100 mg/L, 150 mg/L y 200 mg/L, respectivamente. Tanto las disoluciones madre como las intermedias de los estándares internos se almacenaron en viales sililados ámbar, en refrigeración a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

Las disoluciones de trabajo en mezcla (niveles de calibración) se prepararon a partir de la disolución intermedia en acetonitrilo, pipeteando el volumen de disolución intermedia y de acetonitrilo que se detallan en el siguiente cuadro.

Cuadro VI. Volúmenes de la disolución intermedia y de acetonitrilo utilizados para la preparación de disoluciones de trabajo. Se indica la concentración de cada nivel de calibración.

Nivel de calibración	Alícuota tomada de disolución intermedia (μL)	Cantidad de acetonitrilo (± 1 μL)	Concentración del nivel de calibración preparado (mg/L)
1	50.0 ± 0.2	1950	1.25
2	100.0 ± 0.2	1900	2.50
3	150.0 ± 0.2	1850	3.75
4	200.0 ± 0.2	1800	5.00
5	250 ± 1	1750	6.25
6	300 ± 1	1700	7.50
7	400 ± 1	1600	10.0
8	500 ± 1	1500	12.5
9	600 ± 1	1400	15.0

La adición del estándar interno se realizó pipeteando 950 μL de cada nivel de calibración y 50.0 μL de la disolución intermedia del estándar interno correspondiente.

4.4. Equipo utilizado

Se utilizó un cromatógrafo de gases (GC/MSD-EI) marca Agilent Technologies modelo 7890A con automuestreador marca Agilent Technologies modelo 7693, acoplado a un espectrómetro de relación masa/carga de baja resolución con ionización por impacto electrónico a un potencial de 70 eV, marca Agilent Technologies modelo 5975C. Una fotografía del equipo se presenta en la siguiente figura.



Figura 10. Fotografía del cromatógrafo de gases Agilent Technologies modelo 7890A con detector 5975C.⁸²

Se utilizó una columna capilar HP5UI, no polar (5 %-fenil)-metilpolisiloxano de 30 m de longitud, 25 μm de película enlazada y 0.25 μm de diámetro interno, marca Agilent Technologies J & W, ultra inerte, número de parte 19091S-433UI. El liner utilizado es de vidrio, ultrainerte, tipo sin división "splitless" de 900 μL de capacidad con 4 mm de diámetro interno, de un solo cono simple con lana de vidrio, marca Agilent Technologies, número de parte 5190-2293.

4.5. Metodología de extracción por QuEChERS

La metodología de extracción utilizada es una modificación del método de extracción para residuos de plaguicidas en alimentos por la técnica QuEChERS definida por la Norma Europea EN15662:2008 aprobada por el Comité Europeo de Normalización (CEN). La modificación realizada consistió en una reducción a un quinto de la cantidad de muestra a extraer, la aplicación en bebidas y un aumento de los niveles de concentración de trabajo de dos órdenes de magnitud.¹³

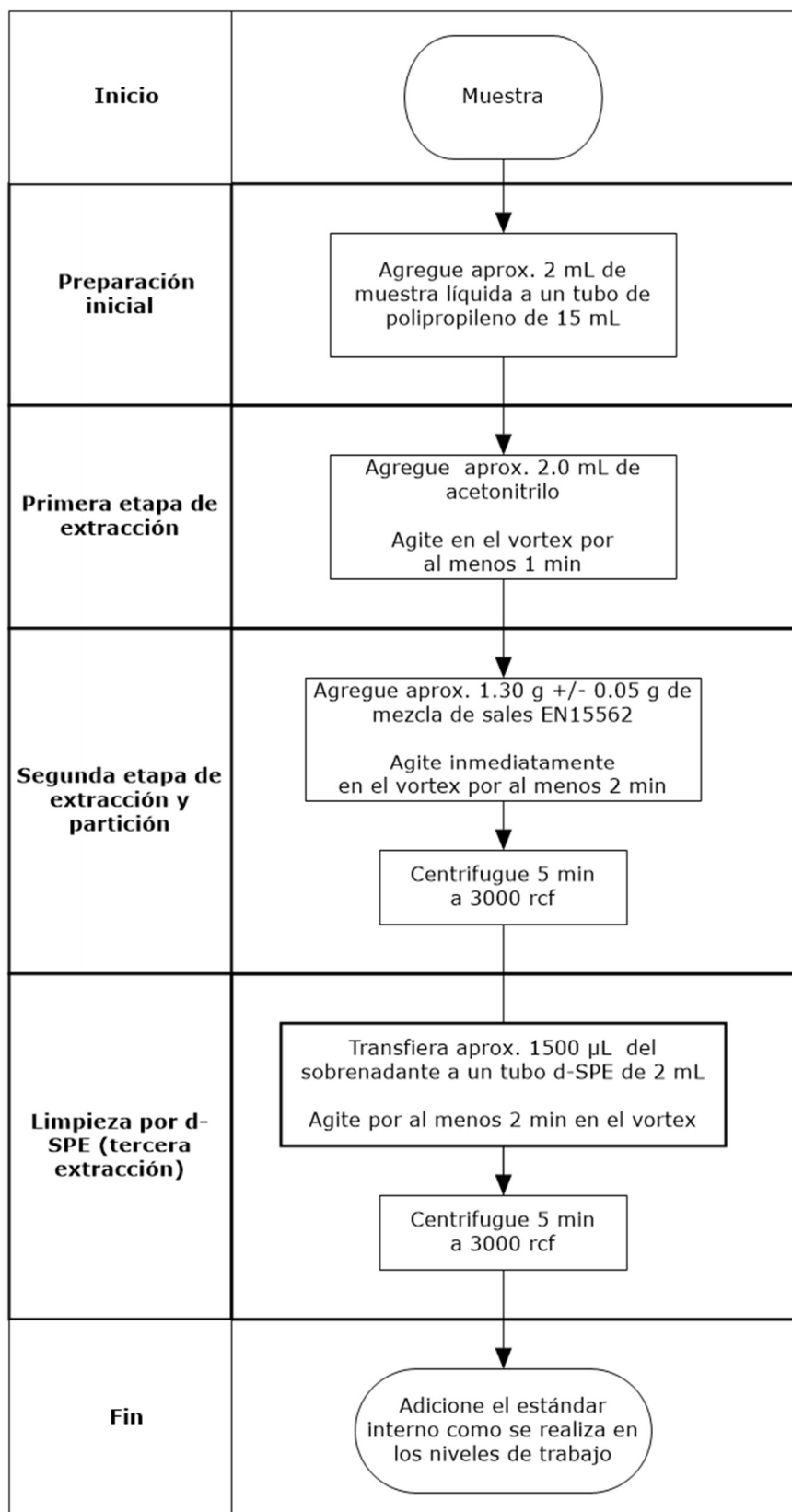


Figura 11. Diagrama de la metodología de extracción por QuEChERS validada.

4.6. Desarrollo de la metodología instrumental

Las condiciones cromatográficas se establecieron al tomar en consideración las recomendaciones básicas para la técnica de cromatografía de gases. Se evaluó que en estas condiciones se tuviera una separación aceptable entre los picos (Resolución cromatográfica $R_s > 1.5$) en el menor tiempo posible. Para esto se utilizó gradientes de temperatura y de flujo del gas de arrastre.

Ver en el cuadro VII las condiciones cromatográficas del método validado.

Cuadro VII. Condiciones cromatográficas del método validado.

Volumen inyección	1 μ L
Temperatura del inyector	250 °C
Flujo de purga del septum	3 mL/min, modo estándar
Modo inyección	Sin división "splitless" pulsado Presión del pulso de inyección: 25.0 psi hasta 0.5 min, un flujo de purga hacia el venteo "split vent" de 60 mL/min a partir de 1 min Ahorro de gas en la purga a un flujo de 16.4 mL/min después de 3 min
Flujo de la columna	Gas de arrastre: He UPA Modo del flujo del gas de arrastre: rampa de flujo. 1.3 mL/min por 12.5 min, luego un incremento a una tasa de 1.0 mL/min hasta 1.5 mL/min por 3.30 min y luego un incremento a una tasa de 1.0 mL/min hasta 1.7 mL/min por 5.80 min. Un flujo post corrida en 1.7 mL/min por 1.00 min
Horno	70.0 °C por 2.00 min, luego a una tasa de 20 °C/min hasta 280 °C por 3.50 min, luego a una tasa de 40 °C/min hasta 300 °C por 5.50 min. Temperatura post corrida 300 °C por 1 min
Temperatura interfase	280 °C

La temperatura de la interfase entre el GC y el MSD, así como la temperatura de la fuente de iones se estableció en 280 °C por recomendación del fabricante del equipo para una mayor limpieza de la fuente de iones.

Para el análisis en modo SIM se seleccionó para cada analito, por medio de un espectro adquirido en modo SCAN, un pico cuantificador y tres calificadores para cumplir con los criterios de identificación por GC/MS establecidos por WADA para compuestos orgánicos semivolátiles.¹⁵ Para el estándar interno solo se seleccionó un calificador, ya que es una sustancia conocida que se agrega. La selección se hizo a partir de la inyección de una disolución en mezcla de los analitos a 10.0 mg/L.

Cuadro VIII. Condiciones del detector del método validado.

Temperatura de la fuente de iones	280 °C						
Temperatura del cuadrupolo	150 °C						
Corte del disolvente	3.50 min						
Tipo de adquisición	SIM y SCAN						
Segmentos de tiempo para los modos SCAN y SIM	Segmentos de adquisición en modo SCAN						
	Tr (min)	Ámbito de masas (g)	Umbral	Velocidad de escaneo (s)	Frecuencia (escaneos/s)	Tiempo de ciclo (ms)	Tamaño del paso (m/z)
	3.50	44.00 – 460.00	150	1.562 [N = 2]	3.5	288.85	0,1
	11.41	44.00 – 565.00	150	1.562 [N = 2]	2.8	256.06	0,1
	Segmentos de adquisición en modo SIM						
	Tr (min)	Analito	Ion base	Iones calificadores			Resolución
	4.11	etoprofós	158.05	126.00	139.05	200.00	Alta
	9.23	forato	75.10	96.95	121.05	231.00	Alta
	9.69	diazinón	137.10	152.10	179.15	199.15	Alta
		antraceno	178.20	152.10	N/A	N/A	Alta
	10.27	metilparatión	109.05	79.05	125.00	263.00	Alta
	10.67	malatión	125.00	127.10	158.00	173.10	Alta
	10.91	clorpirifós	196.95	198.95	257.90	314.00	Alta
12.13	tetrafeniletileno	253.15	332.25	N/A	N/A	Alta	
	trifenilfosfato	326.10	325.10	N/A	N/A	Alta	

Los iones seleccionados (base y calificadores) fueron optimizados mediante el procedimiento de calibración dinámica recomendado por Agilent Technologies,⁸³ el cual consiste en medir en SIM los valores de m/z de cada ión seleccionado, en un ámbito de

± 2 m/z cada 0.05 m/z y se selecciona el valor m/z de mayor repuesta. La evaluación se realizó a tres niveles de calibración (5.00 mg/L; 7.50 mg/L y 10.0 mg/L) por triplicado.

4.7. Metodología de los parámetros de desempeño instrumentales para una metodología por GC/MSD-EI para la separación y caracterización de forato, malatión etoprofos, clorpirifós, diazinón y metilparatión.

Para el presente trabajo de investigación se definió utilizar un esquema analítico integrado con los criterios de SWGDRUG, OSAC y de WADA.

4.7.1. Ámbito para el análisis cualitativo, linealidad y cedasticidad

El ámbito dinámico de concentración para el análisis cualitativo se evaluó mediante la preparación de una curva de calibración de nueve niveles entre 1.25 mg/L y 15.0 mg/L (Cuadro VII). Luego se seleccionó cinco niveles (2.50 mg/L, 3.75 mg/L, 5.00 mg/L, 7.50 mg/L y 10.0 mg/L). Tanto la linealidad como la cedasticidad fueron evaluados mediante cinco curvas de calibración de una réplica cada una en diferentes días (interdía) y con una curva de calibración de dos réplicas inyectadas en el equipo de manera que se tuvo cinco inyecciones en un solo día (intradía) de los niveles seleccionados previamente.

Cuadro IX. Concentraciones utilizadas en la curva de calibración.

Nivel	Concentración
1	1.25 mg/L
2	2.50 mg/L
3	3.75 mg/L
4	5.00 mg/L
5	6.25 mg/L
6	7.50 mg/L
7	10.0 mg/L
8	12.5 mg/L
9	15.0 mg/L

El parámetro de linealidad se analizó mediante el coeficiente de determinación y por el análisis F de ANOVA, sus criterios de aceptación es que el coeficiente de determinación no fuera menor de 0.99 ⁷⁸ y para el análisis F de ANOVA es que el F crítico debe ser menor a los F de ANOVA calculados para cada analito. El F crítico es el valor obtenido para una confianza del 95 % y los grados de libertad correspondientes de un F de ANOVA.

en el cual se calculó el F crítico para n menos dos grados de libertad, con un 95 % de confianza. Además de un coeficiente de determinación no menor de 0.99.⁷⁸

Para evaluar la cedasticidad se utilizó la prueba de Bartlett.⁸⁴ Tanto este parámetro como la linealidad se evaluaron en Microsoft Excel.

4.7.2. Límite de detección, selectividad y precisión

El límite de detección, la selectividad y la precisión se determinaron a partir de los resultados de las curvas de calibración intradía e interdía.

El límite de detección (LD) se estimó según Miller y Miller⁸⁵ para evaluar la repetibilidad y la reproducibilidad, mediante la siguiente ecuación, donde sb corresponde con la incertidumbre estándar (dispersión) del intercepto y m a la pendiente, asumiendo linealidad en el intervalo de bajas concentraciones (Ecuación 2).

$$\text{LD: } \frac{3 * sb}{m}$$

Ecuación 2. Ecuación para la estimación del límite de detección según Miller y Miller.⁸⁵

Para evaluar si la regresión es lineal o cuadrática se utilizó el criterio de F de ANOVA, de manera que se estimaron los LD tanto lineal como cuadrática y la regresión con mayor número de F de ANOVA fue el utilizado como LD.⁸⁵

El límite de cuantificación (LC) se estimó con la siguiente ecuación:

$$\text{LC: } \frac{\text{LD} * 10}{3}$$

Ecuación 3. Ecuación para cálculo del límite de cuantificación.⁸⁵

Los cálculos del LD y del LC se realizaron mediante Microsoft Excel.

La verificación del límite de detección se realizó a una concentración correspondiente al LD más dos desviaciones estándar, para esto se preparó tres repeticiones y se inyectó en el equipo por duplicado.

El criterio de aceptación o rechazo para el límite de detección es menor de 2.5 mg/L, el cual por experiencia del laboratorio es un valor típico de plaguicidas por GC/MSD.⁹

Considerando, el dopado de 350 mL de una bebida con forato (analito más tóxico de los seis) para obtener una concentración equivalente a una dosis letal media para una

persona de 70.0 kg se obtendría una concentración final de 400 mg/L. Dicha concentración es 160 veces mayor que la concentración planteada como criterio de aceptación o rechazo.

La selectividad y la precisión se evaluaron mediante la dispersión del tiempo de retención y las intensidades relativas de tres iones calificadores para cada analito, según lo establecido por la Agencia Mundial Antidoping (WADA)¹⁵ como criterios para el análisis cualitativo de fármacos por GC/MSD por impacto electrónico de baja resolución. Además, los dos primeros criterios deben cumplir que la señal ruido de los analitos sea mayor a 3.¹⁵

4.7.3. Estabilidad de las disoluciones de los analitos

La estabilidad de la disolución intermedia se evaluó hasta por seis meses almacenada a (5 ± 3) °C, mediante la comparación de la respuesta a tres niveles de calibración (2.50 mg/L, 3.75 mg/L y 5.00 mg/L) contrastando la respuesta de la disolución almacenada con la preparada en el mismo día.

La estabilidad de la disolución de los analitos se evaluó al día cero, a los dos meses, cuatro meses y seis meses. Los resultados se obtuvieron según la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de estabilidad: } \frac{\text{área de cada nivel de la disolución t: n meses}}{\text{área de cada nivel de la disolución t: 0 meses}} * 100$$

n: número de mes a evaluar t: tiempo

Ecuación 4. Ecuación para el cálculo del porcentaje de estabilidad de cada mes evaluado para cada nivel.

El criterio de aceptación para este parámetro fue la disminución en la señal, no mayor de un 20 %, según Sagrado para la recuperación, considerando que es un análisis cualitativo.⁷⁵

4.7.4. Efecto memoria

El efecto memoria se evaluó a una concentración de 20.0 mg/L en acetonitrilo de todos los organofosforados evaluados, que corresponde al doble del nivel más alto evaluado en este estudio, seguida de la inyección de dos blancos instrumentales con acetonitrilo y dos controles negativos en matriz (para ambas matrices). El criterio de aceptación para este parámetro fue el no detectar ningún analito en los blancos (S/N < 3 o no identificable).

4.8. Metodología para la determinación de los parámetros de desempeño de la modificación del método QuEChERS EN15662:2008 para la extracción y la limpieza de forato, malatión, etoprofos, clorpirifós, diazinón y metilparatión, en una matriz de jugo de mazana y una matriz de cerveza

4.8.1. Límite de detección en matriz

El límite de detección en matriz se evaluó por aproximación con disminuciones progresivas de concentración, siguiendo la serie Fibonacci.⁸⁵

Para la serie Fibonacci se realizó cuatro concentraciones diferentes a partir de una disolución 50 veces según la concentración C₃. Las concentraciones utilizadas fueron las siguientes:

Cuadro X. Concentraciones utilizadas según la serie Fibonacci.

sustancias	Concentraciones / mg/mL			
	C ₁ (C/1)	C ₂ (C/2)	C ₃ (C/3)	C ₄ (C/5)
etoprofos	4.74	2.37	1.58	0.948
forato	3.72	1.86	1.24	0.744
diazinón	3.12	1.56	1.04	0.624
metilparatión	4.14	2.07	1.38	0.828
malatión	4.26	2.13	1.42	0.852
clorpirifós	2.40	1.20	0.800	0.600

4.8.2. Precisión intermedia

La precisión intermedia se evaluó a dos diferentes concentraciones, al doble del límite de detección determinado experimentalmente y a una concentración de trabajo (por ejemplo 5.00 mg/L). Para ambas concentraciones se prepararon cinco réplicas, se extrajeron en cerveza y en jugo de manzana por dos analistas diferentes y se inyectaron en el equipo por duplicado, un tercer analista realizó lo mismo, pero solo al doble del límite de detección.

El criterio de aceptación fue la detección (S/N > 3) e identificación del analito en al menos un 80 % de las inyecciones para cada nivel de ambos analistas para el doble del LD y un 100 % de las inyecciones para cada nivel de ambos analistas para la concentración de trabajo.

4.8.3. Estabilidad del extracto en bandeja de inyección

La estabilidad de los analitos en la bandeja de inyección en las condiciones del laboratorio (21 ± 1 °C) se evaluó en el extracto (para ambas matrices) a las 24 h, 48 h y 72 h, contrastando con la respuesta a las 0 horas. Por la alta demanda de muestras que se trabajan, una muestra puede permanecer en la bandeja de inyección hasta las 72 horas.

El análisis se realizó con una réplica a cinco niveles de calibración (2.50 mg/L, 3.75 mg/L, 5.00 mg/L, 7.50 mg/L y 10.0 mg/L), cada nivel inyectado por triplicado.

Los resultados se evaluaron en las diferentes horas por la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de estab.: } \frac{\text{prom. área obtenida de cada nivel a las n horas}}{\text{prom. área obtenida de cada nivel a las 0 horas}}$$

estab.: estabilidad

prom.: promedio

Ecuación 5. Ecuación del cálculo del porcentaje de estabilidad para cada nivel al número de hora evaluado.

El criterio de aceptación para este parámetro fue la disminución de la señal no mayor del 20 % menos hasta las 72 horas.

4.8.4. Estabilidad del extracto en refrigeración

La estabilidad de los analitos en refrigeración ((5 ± 3) °C) se evaluó en el extracto (para ambas matrices) a los 8 días y 15 días, contrastando con la respuesta a los 0 días. Este ámbito de tiempo se seleccionó considerando que una muestra puede ser almenada por al menos tres días antes de que el equipo esté disponible para su análisis.

El análisis se realizó con una réplica a cinco niveles de calibración (2.50 mg/L, 3.75 mg/L, 5.00 mg/L, 7.50 mg/L y 10.0 mg/L), cada nivel inyectado por triplicado.

Los resultados se evaluaron en los diferentes días por la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de estab.: } \frac{\text{prom. área obtenida de cada nivel a las n días}}{\text{prom. área obtenida de cada nivel a las 0 días}}$$

prom.: promedio

n: número

Ecuación 6. Ecuación del cálculo del porcentaje de estabilidad de cada nivel al número de día evaluado.

El criterio de aceptación para este parámetro fue la disminución de la señal en un 20 % hasta los 15 días.

4.8.5. Eficiencia del método para la recuperación de los analitos

Este parámetro se analizó según lo planteado por Usui⁴⁸ en ambas matrices, mediante dos curvas de calibración de cinco niveles (2.5 mg/L, 3.75 mg/L, 5.00 mg/L, 7.50 mg/L y 10.0 mg/L) preparadas de dos maneras: la primera se enriqueció cada matriz por triplicado para cada nivel y luego se realizó la extracción (matriz enriquecida extraída, MEE), y la segunda curva de calibración se preparó dopando posterior a la etapa de extracción (matriz extraída dopada, MED).

Los resultados de la eficiencia de la recuperación se evaluaron según la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de recuperación: } \frac{\text{MEE}}{\text{MED}} * 100$$

MEE: nivel enriquecido en cada matriz para su extracción

MED: nivel enriquecido en cada matriz después de haber sido extraída

Ecuación 7. Ecuación del cálculo del porcentaje de recuperación para cada nivel.

En este mismo parámetro también se evaluó el efecto matriz según lo planteado por Usui⁴⁸ mediante la curva de calibración preparada con la matriz extraída (matriz extraída dopada, MED) y otra curva preparada en acetonitrilo (curva instrumental, CI) inyectada en el equipo por triplicado en cada nivel (2.5 mg/L, 3.75 mg/L, 5.00 mg/L, 7.50 mg/L y 10.0 mg/L).

Los resultados del efecto matriz se analizaron según la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de recuperación: } \frac{\text{MED}}{\text{CI}} * 100$$

MED: nivel enriquecido en cada matriz después de haber sido extraída

CI: nivel preparado en acetonitrilo

Ecuación 8. Ecuación del cálculo del porcentaje del efecto matriz para cada nivel.

Los criterios de aceptación fueron que las curvas de calibración en matriz sin dopar obtuvieran un coeficiente de determinación no menor de 0.99⁷⁸ y que la eficiencia de la recuperación como para el efecto matriz fue entre el 85 % y el 115 % de recuperación.⁷⁵

4.8.6. Robustez: efecto de la composición del tubo d-SPE en la recuperación

El efecto de la composición del tubo de d-SPE se evaluó con la extracción de tres réplicas en cada matriz a 5.00 mg/L, inyectadas por duplicado para cada tipo diferente de composición de resinas. La composición de resinas evaluadas fue:

- 25 mg de PSA y 150 mg de 19+1
- 25 mg de PSA, 25 mg C18EN y 150 mg 59+1
- 25 mg de PSA y 150 mg MgSO₄ anhidro.

El efecto de las resinas anteriores se evaluó contrastando la respuesta contra la de la resina validada: 25 mg de PsSA y 150 mg de 59+1.

El criterio de aceptación para este parámetro fue una recuperación no menor del 80 %.⁷⁵ Las diferencias significativas se evaluaron estadísticamente con un 95 % de confianza.

4.8.7. Veracidad

Para la evaluación de la veracidad del método de extracción modificado se comparó la recuperación reportada¹³ en el método oficial para los seis analitos, contra los resultados obtenidos en esta misma matriz aplicando la modificación del método validado y contra los resultados obtenidos en esta misma matriz sin aplicar la modificación del método. La selección de fresas como matriz, obedece a que este parámetro se utiliza para evaluar la modificación del método de extracción y ésta es una matriz reportada en el método oficial para los seis analitos de este proyecto. Veracidad, es un parámetro de validación cuantitativo, por lo que éste no es importante ser determinado en la metodología validada que es cualitativa.

Se tomaron 100,00 g de fresas congeladas (-18 °C), se trozaron en cuatro pedazos y se licuaron. El licuado se dopó con 187.5 µL de cada disolución madre de los analitos (2.00 g/L), lo que permite obtener una concentración teórica de inyección equivalente a 3.75 mg/L. La muestra dopada se homogenizó en el ultra-turrax. Lo descrito se observa en la siguiente figura.



Figura 12. En la figura izquierda se muestra las fresas ya procesadas en el ultra turrax y en la figura de la derecha las fresas antes y después de haber sido procesadas.

En la Figura 13 se muestra la cantidad de la matriz dopada y utilizada para las extracciones por el método QuEChERS EN15662:2008 oficial y modificado.¹³

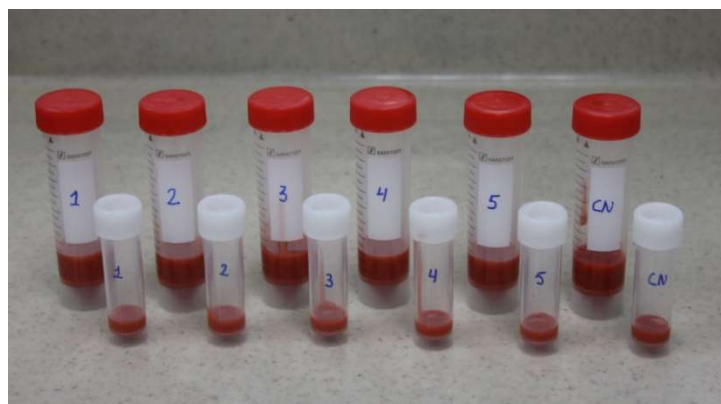


Figura 13. Etapa de preparación inicial del procedimiento de extracción de las fresas procesadas y dopadas por medio del método QuEChERS EN15662:2008 oficial y del método QuEChERS EN15662:2008 modificado.

Los resultados de la veracidad se evaluaron según la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de recuperación: } \frac{1}{2} * 100$$

1: área normalizada obtenida del método oficial o modificado

2: área normalizada obtenida del método modificado en cerveza

Ecuación 9. Ecuación del cálculo del porcentaje de recuperación.

Se tomó en cuenta los resultados del método modificado en cerveza, ya que presentó recuperaciones similares tanto al método oficial y al modificado en fresas. El criterio de aceptación para este parámetro fue un porcentaje de veracidad del 85 % o mayor. Para comparar ambos métodos y corroborar si hubo diferencias significativas se realizó la prueba t con un 95 % de confianza, la cual tiene la siguiente ecuación:

$$t = \frac{(\bar{x} - \mu) * \sqrt{n}}{s}$$

\bar{x} : promedio porcentajes de recuperación de cada réplica

μ : valor de referencia

n: número de réplicas

s: desviación estándar de las réplicas iguales

Ecuación 10. Ecuación de la prueba t.

Si el valor absoluto de los resultados de t para los analitos es menor que el t teórico, entonces se considera que no hay diferencia significativa.

4.9. Metodología para el análisis del efecto de las diferentes concentraciones de etanol en cerveza dopada y la evaluación del desempeño de la metodología validada en matrices diferentes de cervezas y jugos de manzana de acuerdo con los criterios de Horwitz y a los criterios de Westgard

4.9.1. Rugosidad

La rugosidad se evaluó modificando el tipo de matriz. Para esto se aplicó la metodología validada en seis marcas diferentes de jugos de manzana y seis marcas diferentes de cervezas con el fin de determinar si las diferencia entre los ingredientes, sus proporciones y tonalidades de una misma familia de muestras afectan la metodología de extracción.

Los resultados de los porcentajes de recuperación se realizaron según lo descrito en el parámetro de la eficiencia de la recuperación, tomando las áreas normalizadas de las diferentes cervezas o jugos de manzana y dividiéndolos contra los resultados obtenidos en la cerveza o jugo de manzana utilizados en la validación. Se realizó de esta manera por la importancia que demostró el efecto matriz, sin embargo, si fuera una validación cuantitativa se hubiera tenido que realizar en cada cerveza o jugo de manzana diferente y no con los resultados obtenidos de las matrices utilizadas en la validación.

Para cada matriz se preparó tres réplicas dopando a 3.75 mg/L de cada analito, inyectando por duplicado cada réplica. El criterio de aceptación fue entre el 85 % y el 115 % de porcentaje de recuperación de cada analito para cada matriz.⁷⁵

Para determinar el desempeño de la metodología en las diferentes marcas de cervezas y jugos de manzana se utilizó el criterio de Westgard⁷⁸, mediante el sesgo total y los coeficientes teóricos. El sesgo total es la suma de un coeficiente de variación, el cual se obtuvo del criterio de Horwitz⁷⁷, y un porcentaje de sesgo en donde se analizó con dos valores diferentes, uno recomendado por el investigador Sagrado⁷⁵ y otro que es aceptado por el Departamento de Ciencias forenses.

4.9.2. Robustez: efecto etanol

Se preparó tres réplicas a una concentración de 3.75 mg/L en matriz de cerveza de código B, dopando para obtener 12 mL/100 mL de etanol y en matriz de cerveza de código A. Todas las réplicas se inyectaron en el equipo por duplicado.

La preparación del dopado con etanol a la cerveza de código B se realizó agregando 1200 µL de etanol a un balón aforado de 10.00 mL y se aforó con la cerveza mencionada.

Los resultados del efecto etanol se calcularon según la siguiente fórmula.

$$\text{Porcentaje de recuperación: } \frac{\text{promedio de áreas a n \% de alcohol}}{\text{promedio de áreas a 0 \% de alcohol}} * 100$$

n: porcentaje de contenido de etanol

Ecuación 11. Cálculo del porcentaje de recuperación para cada analito en los diferentes porcentajes de alcohol evaluados.

El criterio de aceptación para este parámetro fue que el efecto del etanol afectara la recuperación en un 20 % o menos.

Para determinar el desempeño de la metodología en los diferentes porcentajes de alcohol se utilizó el criterio de Horwitz de la misma manera que se usó en la rugosidad.

Capítulo 5. Resultados y discusión

5.1. Evaluación de los parámetros de desempeño instrumentales para una metodología por GC/MSD-EI para la separación y caracterización de forato, malatión etoprofos, clorpirifós, diazinón y metilparatión

5.1.1. Establecimiento de las condiciones cromatográficas y de detección

Se realizó la evaluación de las condiciones cromatográficas del método mediante una mezcla de diferentes estándares internos, los cuáles fueron seleccionados según su disponibilidad, las recomendaciones del método oficial y las recomendaciones de la literatura. El método oficial recomienda como estándares internos: PCB 18, PCB 28, PCB 52, trifenilfosfato, tris-(1,3-dicloroisopropil)-fosfato, trifenilmetano y bis-nitrofenil urea; y como estándares de control de calidad: PCB 138, PCB 135 y antraceno. Los estándares internos seleccionados fueron: trifenilfosfato, antraceno, etión y tetrafeniletileno.¹³ El etión fue escogido por que cumple con las recomendaciones de la literatura al presentar una estructura química similar a los analitos y un tiempo de retención en medio de estos, sin embargo, se descarta porque a pesar de estar prohibido en Costa Rica, se encontraron casos reales de intoxicación con productos de uso veterinario con etión.⁹

Tanto como para el establecimiento de las condiciones cromatográficas y de detección como para el resto de los parámetros, se empleó como disolvente acetonitrilo, porque es el disolvente utilizado en el método oficial EN 15662:2008 y porque, según un estudio donde se evaluaron los tres disolventes más comunes para extraer plaguicidas (acetona, acetonitrilo y acetato de etilo), el acetonitrilo mostró los mejores resultados en GC/MSD.^{13,86}

Los espectros de relación masa carga del trifenilfosfato, antraceno y tetrafeniletileno se muestran en la siguiente figura.

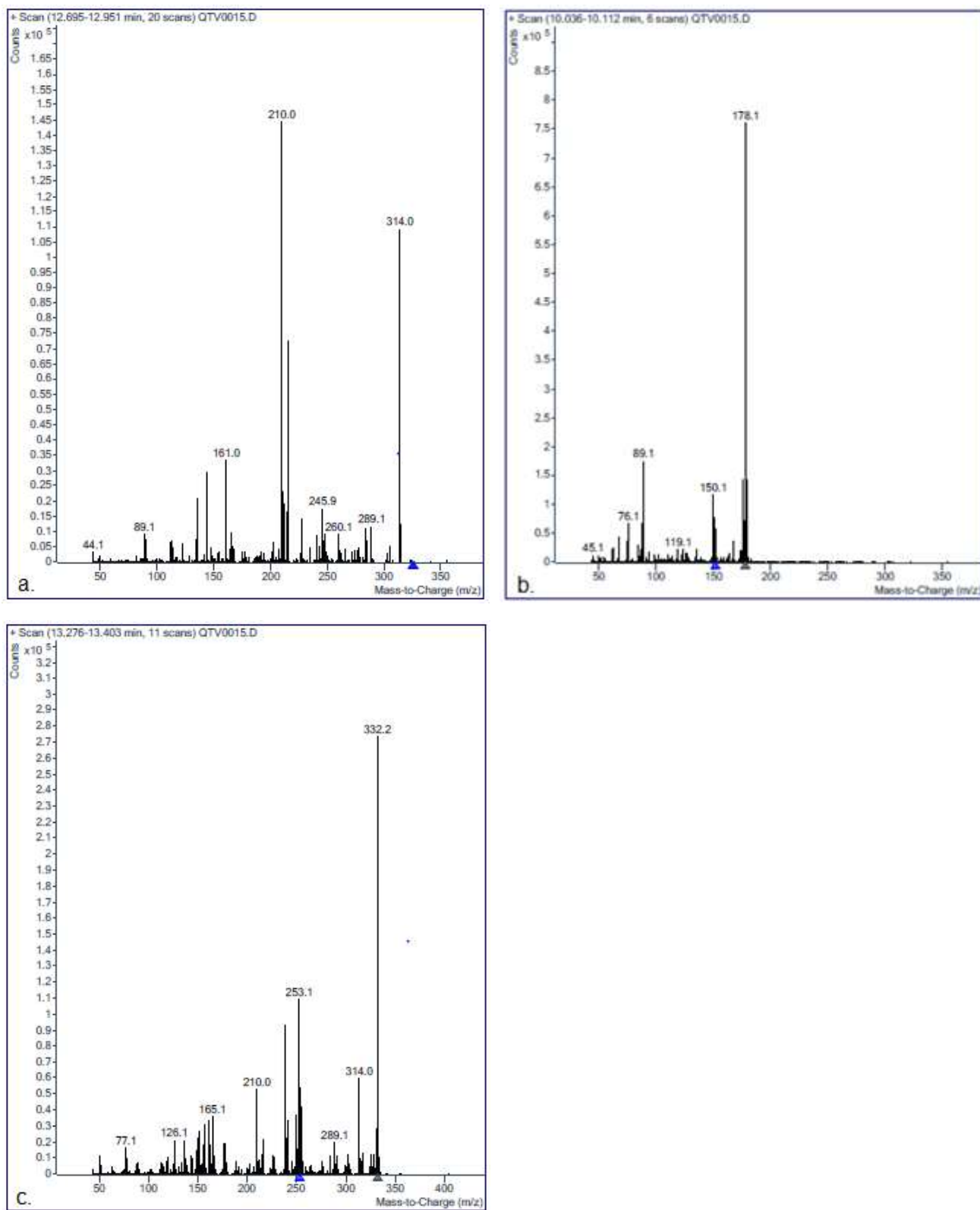


Figura 14. Espectros de masa de a. trifenilfosfato, b. antraceno y c. tetrafeniletileno.

Como se muestra en la Figura 12 los estándares internos seleccionados presentan un espectro de relación masa carga que permite ser utilizado en modo de monitoreo de iones selectivos (SIM) pues, el pico base es de alta masa/carga, lo que aumenta la selectividad del ión, ya que la probabilidad de presencia de impurezas aumenta conforme disminuye la relación masa/carga del fragmento.⁸³ Al evaluar las condiciones cromatográficas mediante una mezcla de los tres estándares internos en el método anterior se observó el efecto memoria, por lo cual se decide revisar y modificar las condiciones del método a validar con las recomendaciones de la literatura.

Los cambios de las condiciones cromatográficas se observan en el Cuadro XI, siendo los principales cambios para disminuir el efecto memoria la modalidad de inyección de split pulsado por splitless pulsado, la temperatura inicial del horno y el aumento de la temperatura de la cámara de ionización de 230 °C a 280 °C.

Cuadro XI. Diferencias de las condiciones entre el anterior y el actual método cromatográfico.

Condiciones cromatográficas	Anterior	Desarrollado
Condiciones del inyector		
Modo de inyección	Split pulsado	Splitless pulsado
Temperatura del puerto de inyección	200 °C	250 °C
Flujo de purga del septum	3.00 mL/min	3.00 mL/min
Presión	12.69 psi	11.99 psi
Presión de la inyección pulsada	No aplica	25.00 psi, 0.50 min Con un flujo de purga hacia el Split vent de 60 mL/min al 1 min
Tiempo de ahorro de gas (saver time)	15.0 mL/min, 3.00 min	16.4 mL/min, 3.00 min
Condiciones del horno		
Temperatura inicial	75 °C, 2.00 min	70 °C, 2.00 min
Programación de temperatura	Rampa 20 °C/min hasta 270 °C	Rampa 20 °C/min hasta 280 °C
Tiempo de corrida	30 min	16 min
Condiciones de la Columna capilar		
Flujo inicial	1.30 mL/min	1.30 mL/min, 12.50 min
Programación de flujo	No aplica	Rampa 1.50 mL/min por 3.30 min
Velocidad promedio	42.00 cm/sec	42.13 cm/sec
Condiciones del detector de masa/carga		
Modo	SCAN	SIM/SCAN
Rango de detección	45 uma a 650 uma	44 uma a 565 uma
MS fuente	230 °C	280 °C

En las condiciones del inyector se modificó de modo de inyección split pulsado a splitless pulsado. Con el splitless se asegura que toda la muestra entre a la columna, evitando una dilución a través del flujo de purga y, por ende, solo después de la inyección de la muestra se abre el flujo de purga y se elimina el resto de vapor del disolvente. Con esto, se evita que este se acumule y al ser pulsado hay un aumento de presión donde los analitos tienen menos contacto con el puerto de inyección y llegan más rápido a la primera porción de la columna, evitando posible degradación térmica de la muestra.⁸⁷

Para este tipo de inyectores la purga debe realizarse alrededor de 20 segundos después de la inyección, ya que si se realiza muy pronto se puede perder parte de la muestra, resultando en una mala cuantificación. Pero si se deja más tiempo puede generar coleo en la señal del disolvente con un aumento de la línea base.^{62,65} La purga en el método se realizó al minuto de inicio de la inyección, dejándose más tiempo según lo recomendado, sin embargo, no se observó un aumento en la línea base, por lo que no fue necesario disminuir el tiempo de la purga.

Las sustancias al evaporizarse en la cámara de inyección se consideran que poseen un comportamiento de gases ideales, siendo así se mantuvo el volumen de inyección de 1.00 μL . El porcentaje de muestra utilizado en el liner, según el programa del equipo, fue del 49 %, por lo que no se excede la capacidad máxima del liner y se evitó contaminación en el puerto de inyección.

Para las condiciones del horno, se cambió la temperatura inicial, reduciendo al menos 10 °C por debajo del punto de ebullición del acetonitrilo, el cual es de 82 °C. Esta situación fue para condensar los analitos en la entrada de la columna y que se revolatilizan cuando la temperatura vaya aumentando, para obtener picos agudos en el cromatograma. Además, se aumentó la temperatura final de la rampa para obtener una mejor separación de los picos cromatográficos. El aumento de este último parámetro junto con la programación del flujo en la columna ayudó a disminuir el tiempo de elución de los analitos sin dañar la resolución entre estos.^{65,88}

Las modificaciones que se realizaron para el detector de masa/carga fue el modo de adquisición, cambiando a SIM/SCAN. Esto con el fin de mejorar la sensibilidad de escaneo para los iones de los analitos por el modo SIM, pero sin dejar de lado el modo SCAN, ya que, a la hora de analizar muestras reales, es necesario haber adquirido todas las sustancias que contenían los indicios para identificar si hay algún otro analito que sea necesario conocer su presencia. Según las recomendaciones para el ámbito de escaneo, el límite superior debe ser al menos 50 una mayor que del analito más pesado, por lo tanto, tomando en cuenta ese criterio e incluyendo no solo los analitos del proyecto sino también otros plaguicidas se redujo el rango.^{89,90}

Además, se aumentó la temperatura de la fuente de ionización, de manera que fuera igual a la de la interfase para que los iones no eluyeran de la interfase hacia la fuente con una temperatura más baja, provocando que no se favorezca el flujo de salida y una posible detección incompleta de los analitos.

Con los cambios realizados en el método cromatográfico se obtuvo un coeficiente de variación de 12 repeticiones del tetrafeniletileno, antraceno y trifenilfosfato de 1.4 %, 2.2 % y 8.0 %, respectivamente. En la Figura 15 se observa el cromatograma de los analitos junto con los estándares internos.

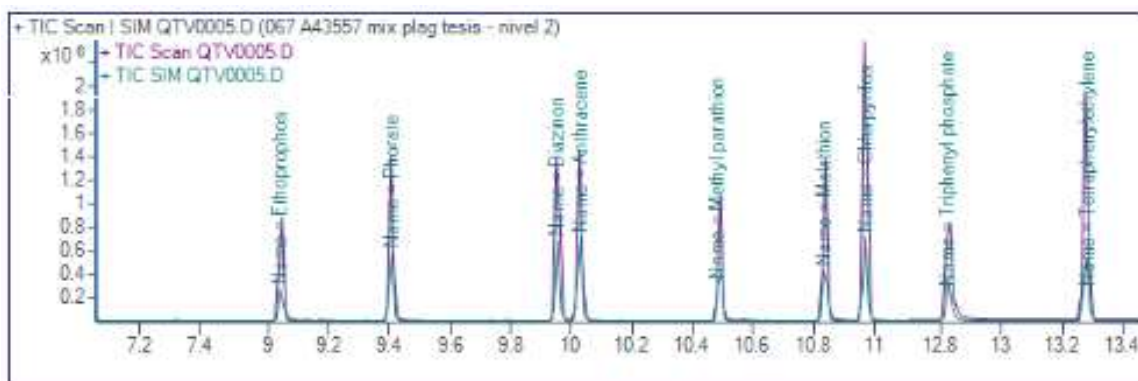


Figura 15. Cromatograma de los analitos junto con los estándares internos adquiridos en modo SCAN y en modo SIM para la concentración 3.75 mg/L.

Se seleccionó tetrafeniletileno como estándar interno, ya que mostró un menor coeficiente de variación con un 1.4 %, aunque el uso del antraceno también es aceptable. No se utilizó trifenilfosfato a pesar de que era uno de los estándares internos recomendados por el método oficial de QuEChERS¹³, porque fue el que presentó el mayor coeficiente de variación con un 8.0 %.

Como se mencionó anteriormente, el estándar interno cromatográfico mejora la precisión de la señal analítica, minimizando las fluctuaciones instrumentales, las inestabilidades y los efectos de la matriz.⁵⁹ Por estas razones se utiliza para normalizar las señales (área bajo la curva) de cada analito en una misma inyección en todos los parámetros donde sean necesarios estos resultados para demás cálculos.

5.1.2. Selección de iones principales

La medición y la selección de los iones tanto los base como los calificadores se realizó a partir de la respuesta obtenida con los materiales de referencia. Al ser un detector de baja resolución y de simple cuadrupolo la caracterización requiere del análisis de no menos de tres iones calificadores.¹⁵

En Química Forense, la identificación de una sustancia química por espectrometría de masas se realiza por la comparación espectral contra la respuesta obtenida por un material de referencia certificado y no por una elucidación estructural^{15, 16}. La garantía que el espectro obtenido para el material de referencia corresponde a la sustancia en cuestión se da por la presencia del pico molecular en todos los espectros, y la comparación contra bibliotecas comerciales reconocidas como la NIST y la PEST, presentando índices de comparación superiores al 90%. Adicionalmente en el Anexo 03 se presentan una propuesta de las estructuras de los fragmentos positivos más abundantes (ión base) y al menos un ión calificador para cada analito.

Los iones seleccionados (Ver Cuadro XII) presentan alta relación masa/carga para evitar posibles iones anómalos como lo es el ión de 73 m/z y el 295 m/z (siendo este el de mayor relación masa/carga)⁸³, con excepción del ión base del forato (75.1 m/z) y un calificador del metilparatión (79.1 m/z), los cuales fueron escogidos ya que presentaron estabilidad en pruebas realizadas en el DCF anteriormente.

La intensidad relativa de los iones seleccionados fue de al menos un 10 %⁸³ y mostraron baja variabilidad cumpliendo con las ventanas de tolerancia máxima de WADA¹⁵, lo cual se corroboró más adelante en las curvas de calibración tanto interdía como intradía.

5.1.3. Calibración dinámica

Para determinar el valor de mayor sensibilidad del pico base y de los iones calificadores dentro de la resolución del espectrómetro de masas, se realizó un experimento de calibración dinámica en modo SIM en un intervalo de +/- 0.1 m/z con un paso de +/- 0.05 m/z.⁸³ En la siguiente figura se muestra, como ejemplo, los resultados para uno de los iones del etoprofós.

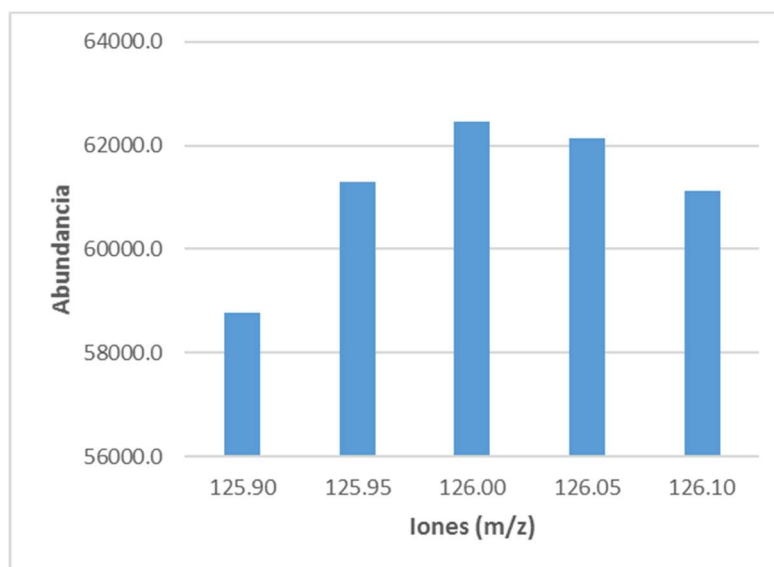


Figura 16. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 126.00 m/z para el etoprofós.

Como se observa en la Figura 16, el ion que presentó mayor abundancia fue 126.00 m/z, por lo que fue seleccionado como uno de los iones calificadoros. Los iones que mostraron mayor abundancia en la calibración dinámica se muestran en el Cuadro XII.

Cuadro XII. Iones base y calificadoros con mayor abundancia en la calibración dinámica.

Analito	Ion base (m/z)	Ion calificador 1 (m/z)	Ion calificador 2 (m/z)	Ion calificador 3 (m/z)
etoprofós	158.05	139.05	126.00	200.00
forato	75.10	96.95	121.05	231.00
diazinón	137.10	152.10	179.15	199.15
metilparatión	109.05	79.05	125.00	263.00
malatión	125.00	127.10	158.00	173.10
clorpirifós	196.95	198.95	257.90	314.00
tetrafeniletile- no	253.15	332.25	--	--

5.1.4. Ámbito para el análisis cualitativo

El ámbito para el análisis cualitativo se evaluó mediante una curva de calibración de nueve niveles que comprendía desde 1.25 mg/L hasta 15.0 mg/L, con los resultados de todos los analitos se seleccionaron cinco niveles, en donde no se observó saturación o pérdida de la linealidad, los niveles seleccionados fueron 2.50 mg/L, 3.75 mg/L, 5.00 mg/L, 7.50 mg/L y 10.0 mg/L.

La regresión lineal de los analitos se evaluó mediante cinco curvas de calibración de una réplica cada una en diferentes días (interdía) y con una curva de calibración de dos réplicas inyectadas en el equipo de manera que se tuvo cinco inyecciones en un solo día (intradía). Los resultados de estas se muestran en los siguientes cuadros.

Cuadro XIII. Regresión lineal para los analitos evaluados intradía con tetrafeniletieno como estándar interno.

Analito	Pendiente	Incertidumbre estándar de la pendiente	Intercepto	Incertidumbre estándar del intercepto	Coefficiente de determinación
etoprobós	0.1882	0.0026	-0.189	0.041	0.9993
forato	0.4210	0.0093	-0.292	0.085	0.9975
diazinón	0.2110	0.0047	-0.055	0.065	0.9983
metilparatió n	0.2692	0.0043	-0.266	0.062	0.9959
malatió	0.2085	0.0051	-0.133	0.032	0.9982
clorpirifós	0.2009	0.0056	0.070	0.036	0.9976

Cuadro XIV. Regresión lineal para los analitos evaluados interdía con tetrafeniletieno como estándar interno.

Analito	Pendiente	Incertidumbre estándar de la pendiente	Intercepto	Incertidumbre estándar del intercepto	Coefficiente de determinación
etoprobós	0.1803	0.0011	-0.1918	0.0070	0.9999
forato	0.4212	0.0054	-0.279	0.034	0.9995
diazinón	0.2113	0.0040	-0.053	0.026	0.9989
metilparatió n	0.27226	0.00081	-0.274	0.018	1.0000
malatió	0.2111	0.0014	-0.178	0.028	0.9999
clorpirifós	0.2199	0.0042	-0.002	0.048	0.9984

El criterio de aceptación para los coeficientes de determinación es que no pueden ser menor a 0.99 y según los resultados se cumple, mostrando que los cálculos de la regresión proveen estimaciones confiables para la pendiente y el intercepto.⁷⁸

Los resultados de las curvas intradía e interdía de la exactitud y la linealidad según el análisis de F de ANOVA se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro XV. Resultados de la cedasticidad y la linealidad para la repetibilidad y para la reproducibilidad.

Repetibilidad			
Analitos	Cedasticidad	F_{ANOVA}	F crítico ($\alpha: 0.05$)
Etoprofós	heterocedástico	1369.05	4.67
Forato	heterocedástico	400.79	4.75
Diazinón	heterocedástico	602.11	4.49
Metilparatión	heterocedástico	244.22	5.99
Malatión	homocedástico	558.39	10.13
Clorpirifós	homocedástico	424.09	10.13
Reproducibilidad			
Analitos	Cedasticidad	F_{ANOVA}	F crítico ($\alpha: 0.05$)
Etoprofós	homocedástico	13721.58	10.13
Forato	homocedástico	3131.60	10.13
Diazinón	homocedástico	919.21	10.13
Metilparatión	heterocedástico	34925.05	4.96
Malatión	heterocedástico	6963.38	4.67
Clorpirifós	heterocedástico	635.50	4.67

El criterio de aceptación para el análisis F de ANOVA es que el F crítico debe ser menor a los F de ANOVA calculados para cada analito.

Como se observa en el último cuadro, el F de ANOVA cumple los criterios establecidos mencionados en la metodología (nivel confianza al 95 %) en la repetibilidad y en la reproducibilidad, indicando que los analitos son lineales. Además, con los resultados obtenidos de la cedasticidad se seleccionó un modelo lineal que se utilizó según corresponde.

5.1.5. Límite de detección

Con los resultados obtenidos de la cedasticidad se utilizó un modelo de regresión lineal simple para resultados homocedásticos o regresión lineal con ponderación estadística para resultados heterocedásticos.⁸⁵

Se realizó la prueba de F de ANOVA para la comparación de varianzas entre las pendientes y los interceptos para así determinar si los LD (nivel confianza al 95 %) para la repetibilidad y para la reproducibilidad son significativamente diferentes mediante las curvas de calibración realizadas, en el siguiente cuadro se muestran los resultados.

Cuadro XVI. Comparaciones entre las pendientes, interceptos y tipo de tratamiento de los LD entre repetibilidad y reproducibilidad.

Analitos	Pendiente	Intercepto	Resultado estadístico
etoprofós	diferente	no diferente	diferente
forato	diferente	no diferente	diferente
diazinón	no diferente	no diferente	diferente
metilparatión	diferente	no diferente	no diferente
malatión	no diferente	no diferente	diferente
clorpirifós	diferente	diferente	diferente

Las comparaciones de la repetibilidad y de la reproducibilidad se realizaron entre las pendientes y los interceptos, ya que el LD se calculó según la Ecuación 2, que se muestra a continuación:

$$LD: \frac{3 * sb}{m}$$

Ecuación 2. Ecuación para la estimación del límite de detección según Miller y Miller.⁸⁵

Donde esta es afectada principalmente por el componente numérico de la pendiente, luego por la dispersión de datos del intercepto y, por último, por el tratamiento realizado, ya sea homocedástico o heterocedástico. Ese mismo orden, es la prioridad que se tuvo a la hora de analizar si los datos son o no diferentes entre ellos.

En el Cuadro XVII se muestran los resultados para el límite de detección tanto de repetibilidad como de reproducibilidad.

Cuadro XVII. Límites de detección de la repetibilidad y reproducibilidad.

Analitos	Experimento de repetibilidad		Experimento de reproducibilidad	
	LD (mg/L)	LC (mg/L)	LD (mg/L)	LC (mg/L)
etoprofós	0.65	2.2	0.12	0.39
forato	0.60	2.0	0.25	0.82
diazinón	0.92	3.1	0.36	1.2
metilparatión	0.69	2.3	0.20	0.67
malatión	0.47	1.6	0.39	1.3
clorpirifós	0.53	1.8	0.66	2.2

El criterio de calidad planteado para este parámetro fue que el límite de detección de los analitos fuera cercano a 2.50 µg/mL. Con los resultados mostrados en el Cuadro XVII se observa que se cumple el criterio planteado tanto en la repetibilidad como en la reproducibilidad.

La verificación del límite de detección mostró que se logró identificar los analitos, aplicando los criterios WADA¹⁵ no solo de los tiempos de retención sino también de las intensidades relativas de los iones.

Los límites de detección de los organofosforados validados en el mismo u otros tipos de equipos instrumentales previamente extraídos de sus matrices oscilan entre 6.0×10^{-5} mg/L a 0.030 mg/L,^{27,30,31,35,40,42} los cuales muestran ser al menos una orden de magnitud menos con respecto a lo obtenido en la validación, esto porque muchos estudios son enfocados en el área de alimentos, aguas o forense en sangre donde es necesario la detección de estos analitos a muy bajas concentraciones utilizando GC/MS-MS, LC/MS u otros equipos siendo estos más sensibles que el usado en el proyecto. Dado que las muestras a las que se sometería la presente metodología están relacionadas con el dopado de plaguicidas con fines criminales y no con un residuo de plaguicidas por un control fitosanitaria o ambiental, se consideran que los límites de detección obtenidos para metodología con una orden de magnitud más altos son aceptables.

5.1.6. Selectividad

La selectividad se evaluó según lo establecido por WADA¹⁵ para el tiempo de retención y las intensidades relativas de los iones calificadores de las curvas de calibración. La precisión se analizó con los resultados de la selectividad de las curvas obtenidas intradía e interdía.

Los resultados de los tiempos de retención evaluados intradía e interdía se muestran en el Cuadro XVIII y en el Cuadro XIX, respectivamente.

Cuadro XVIII. Tiempos de retención para la curva de calibración intradía.

Analito	Promedio (min)	Ámbito según WADA (min)	Mínimo experimental (min)	Máximo experimental (min)
etoprofós	9.039	8.939 - 9.139	9.039	9.039
forato	9.410	9.310 - 9.510	9.398	9.410
diazinón	9.955	9.855 - 10.055	9.955	9.955
metilparatión	10.490	10.385 - 10.595	10.484	10.496
malatión	10.832	10.724 - 10.940	10.832	10.832
clorpirifós	10.971	10.861 - 11.081	10.971	10.971

Cuadro XIX. Tiempos de retención para la curva de calibración interdía.

Analito	Promedio (min)	Ámbito según WADA (min)	Mínimo experimental (min)	Máximo experimental (min)
etoprofós	9.041	8.941 - 9.141	9.039	9.050
forato	9.409	9.309 - 9.509	9.398	9.410
diazinón	9.955	9.855 - 10.055	9.955	9.955
metilparatión	10.492	10.387 - 10.597	10.484	10.496
malatión	10.832	10.724 - 10.941	10.832	10.843
clorpirifós	10.971	10.861 - 11.081	10.971	10.971

Como se observa en los resultados, el tiempo de retención de las curvas de calibración tanto intradía como interdía de los analitos cumplen los criterios WADA.¹⁵ Esto demuestra no solo que con el aumento de la concentración de los analitos no afecta en gran medida los tiempos de retención, sino que 11 días después de haber preparado e inyectado la primera curva, todavía se cumple los criterios hasta la última curva, indicando que se tiene precisión.

Los resultados de las intensidades relativas de los iones de los analitos evaluados intradía e interdía se muestran en el Cuadro XX y Cuadro XXI, respectivamente.

Cuadro XX. Intensidades relativas de los iones de los analitos para la curva de calibración intradía.

Analito	Iones (IR en % con respecto al ión diagnóstico de referencia)	Variabilidad obtenida para la IR	Variabilidad máxima permitida para la IR
etoprofós	139.05 m/z (52.6)	± 2.1 abs	± 10.0 abs
	126.00 m/z (50.7)	± 3.5 abs	± 10.0 abs
	200.00 m/z (28.4)	± 4.2 % rel	± 5.7 % rel
forato	96.95 m/z (26.0)	± 2.3 % rel	± 5.2 % rel
	121.05 m/z (38.2)	± 3.9 % rel	± 7.6 % rel
	231.00 m/z (11.2)	± 7.0 % rel	± 5.0 % rel
diazinón	152.10 m/z (60.7)	± 1.4 abs	± 10.0 abs
	179.15 m/z (85.8)	± 4.8 abs	± 10.0 abs
	199.15 m/z (52.3)	± 2.3 abs	± 10.0 abs
metilparatión	79.05 m/z (29.3)	± 6.8 % rel	± 5.9 % rel
	125.00 m/z (92.2)	± 2.4 abs	± 10.0 abs
	263.00 m/z (59.6)	± 4.1 abs	± 10.0 abs
malatión	127.10 m/z (92.2)	± 8.7 abs	± 10.0 abs
	158.00 m/z (43.6)	± 8.0 % rel	± 8.7 % rel
	173.10 m/z (83.0)	± 9.7 abs	± 10.0 abs
clorpirifós	198.95 m/z (53.2)	± 3.5 abs	± 10.0 abs
	257.90 m/z (38.8)	± 4.6 % rel	± 7.8 % rel

	314.00 m/z (97.5)	± 4.7 abs	± 10.0 abs
--	-------------------	-----------	------------

La intensidad relativa obtenida se reporta como el promedio y la variabilidad obtenida se reporta como la ventana mayor entre la diferencia del promedio y el valor máxima y del promedio y el valor mínimo.

Cuadro XXI. Intensidades relativas de los iones de los analitos para la curva de calibración interdía.

Analito	Iones (IR en % con respecto al ión diagnóstico de referencia)	Variabilidad obtenida para la IR	Variabilidad máxima permitida para la IR
etopofós	139.05 m/z (52.8)	± 2.3 abs	± 10.0 abs
	126.00 m/z (51.0)	± 3.8 abs	± 10.0 abs
	200.00 m/z (28.4)	± 4.9 % rel	± 5.7 % rel
forato	96.95 m/z (26.0)	± 3.5 % rel	± 5.2 % rel
	121.05 m/z (37.5)	± 5.3 % rel	± 7.5 % rel
	231.00 m/z (10.9)	± 1.2 % rel	± 5.0 % rel
diazinón	152.10 m/z (60.0)	± 5.4 abs	± 10.0 abs
	179.15 m/z (85.0)	± 5.0 abs	± 10.0 abs
	199.15 m/z (51.6)	± 3.7 abs	± 10.0 abs
metilparatión	79.05 m/z (29.8)	± 6.4 % rel	± 6.0 % rel
	125.00 m/z (85.7)	± 3.6 abs	± 10.0 abs
	263.00 m/z (58.8)	± 7.5 abs	± 10.0 abs
malatión	127.10 m/z (93.2)	± 16.6 abs	± 10.0 abs
	158.00 m/z (43.2)	± 6.7 % rel	± 8.6 % rel
	173.10 m/z (82.2)	± 8.8 abs	± 10.0 abs
clorpirifós	198.95 m/z (52.7)	± 5.2 abs	± 10.0 abs
	257.90 m/z (38.6)	± 6.5 % rel	± 7.7 % rel
	314.00 m/z (97.0)	± 2.5 abs	± 10.0 abs

Como se observa en los resultados del Cuadro XX, las intensidades relativas de los iones de la curva de calibración intradía pasan los criterios WADA, caso contrario con los resultados de la curva de calibración interdía. En esta última, el ion 127.10 m/z de malatión no pasa el criterio estipulado, demostrando que es necesario preparar una curva cada vez que se realicen extracciones de los analitos, ya que cabe la posibilidad que a la hora de evaluar extracciones con una curva realizada días antes, no alcance a llegar a los criterios establecidos y se tenga que repetir la preparación. Esto indica que no hay precisión interdía.

WADA establece que para la identificación de muestras cuestionadas se debe realizar la comparación contra una curva de calibración de la misma secuencia de análisis, en donde experimentalmente se corrobora que es lo idóneo.

5.1.7. Efecto memoria

En química forense los resultados pueden ser interpretados para incriminar a un inocente o dejar libre a una persona culpable, por esta razón es un requisito en la validación de una metodología cualitativa demostrar que el cromatógrafo no da una señal por el analito después de la inyección de una muestra, a fin de que el equipo esté preparado para la lectura de la siguiente muestra.

Para evaluar el parámetro de efecto memoria se preparó en acetonitrilo todos los organofosforados al doble del nivel más alto evaluado de la curva de calibración. Seguidamente se inyectan varios blancos instrumentales de acetonitrilo o varios controles negativos en matriz (para ambas matrices). Esto se realiza para determinar con cuántos blancos instrumentales o controles negativos son suficientes para que el equipo no de un falso positivo y para determinar cuál preparación es mejor inyectar después de una muestra positiva en un análisis de rutina. El criterio de aceptación para este parámetro fue el no detectar ningún analito en los blancos ($S/N < 3$ o no identificable).

No se detectó efecto memoria de los analitos en los blancos instrumentales o los blancos de matrices (cerveza y jugo de manzana). En la Figura 17 se observa uno de los resultados del etoprofós en el blanco instrumental, donde no se detectó ningún ión seleccionado, lo mismo sucedió para el resto de los analitos en los diferentes blancos.

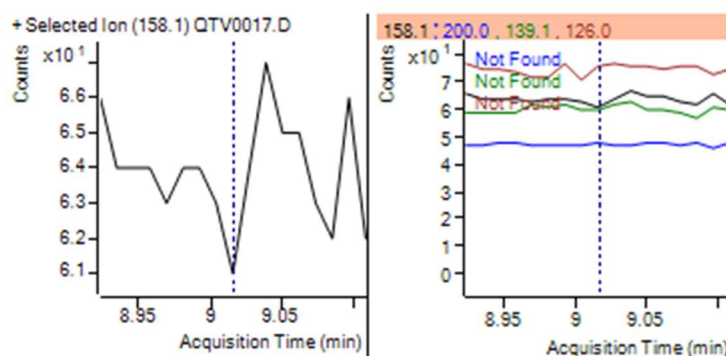


Figura 17. Resultado del efecto memoria del etoprofós en el blanco instrumental.

Estos resultados demuestran que, a una concentración de 20.0 mg/L de los analitos no hay efecto memoria siempre y cuando no exceda el doble del nivel más alto de la curva de calibración.

Este parámetro es importante porque para los indicios recolectados no hay conocimiento de cuál es su concentración, siendo así, a la hora de realizar su extracción hay que tomar en cuenta si proviene de un envase del plaguicida como tal o si es algún líquido

recolectado, ya que de esto dependerá la dilución a realizar. Aún con la dilución realizada hay que verificar si las siguientes inyecciones en la corrida presentó un efecto memoria.

5.1.8. Estabilidad de la disolución intermedia

La estabilidad de la disolución intermedia de los analitos se comparó siempre contra una disolución intermedia nueva a los dos meses, cuatro meses y seis meses, almacenados en refrigeración. En los siguientes cuadros se muestran los resultados en los diferentes meses.

Cuadro XXII. Porcentajes de estabilidad a los dos meses de la disolución intermedia de los analitos.

Concen- tración	etoprofós (%)	forato (%)	diazinón (%)	metilpara- tión (%)	malatión (%)	clorpirifós (%)
2.50 mg/L	103.5	104.7	103.5	97.8	104.0	98.2
3.75 mg/L	99.6	101.9	104.1	97.2	101.2	98.8
5.00 mg/L	101.6	104.1	103.4	99.2	103.5	99.3
Promedio	101.5	103.6	103.7	98.1	102.9	98.7

Cuadro XXIII. Porcentajes de estabilidad a los cuatro meses de la disolución intermedia de los analitos.

Concen- tración	etoprofós (%)	forato (%)	diazinón (%)	metilpara- tión (%)	malatión (%)	clorpirifós (%)
2.50 mg/L	100.8	116.8	106.1	104.4	100.5	101.7
3.75 mg/L	98.7	113.3	104.6	101.5	98.4	101.6
5.00 mg/L	97.7	113.4	104.6	98.5	97.1	103.1
Promedio	99.0	114.5	105.1	101.5	98.7	102.1

Cuadro XXIV. Porcentajes de estabilidad a los seis meses de la disolución intermedia de los analitos.

Concen- tración	etoprofós (%)	forato (%)	diazinón (%)	metilpara- tión (%)	malatión (%)	clorpirifós (%)
2.50 mg/L	109.9	110.9	110.8	87.6	106.8	104.7
3.75 mg/L	104.8	107.8	107.7	89.6	104.1	104.2
5.00 mg/L	97.6	102.9	102.3	91.8	100.4	96.4
Promedio	104.1	107.2	106.9	89.7	103.7	101.8

El criterio de aceptación para este parámetro fue la descomposición hasta de un 20 % o menos, esto por ser una metodología cualitativa.⁷⁵ El valor más bajo detectado fue el de metilparatión a los seis meses con un 89.7 % pero aun así cumple el criterio establecido. Con estos resultados se demuestra que la disolución intermedia tiene una estabilidad aceptable hasta los seis meses para todos los analitos.

5.2. Determinación de los parámetros de desempeño de la modificación del método QuEChERS EN15662:2008 para la extracción y la limpieza de forato, malatión, etoprofos, clorpirifós, diazinón y metilparatión, en una matriz de jugo de mazana y una matriz de cerveza

5.2.1. Límite de detección en matriz

Las concentraciones preparadas para la evaluación del límite de detección se muestran en el Cuadro XXV, siguiendo la serie Fibonacci.

Cuadro XXV. Concentraciones utilizadas según la serie Fibonacci para el límite de detección en matriz.

Concentraciones	C ₁ (C/1) (mg/L)	C ₂ (C/2) (mg/L)	C ₃ (C/3) (mg/L)	C ₄ (C/5) (mg/L)
etoprofos	4.74	2.37	1.58	0.948
forato	3.72	1.86	1.24	0.744
diazinón	3.12	1.56	1.04	0.624
metilparatión	4.14	2.07	1.38	0.828
malatión	4.26	2.13	1.42	0.852
clorpirifós	2.40	1.20	0.800	0.600

En cerveza la concentración en donde se detectó e identificó todos los analitos con los criterios establecidos fue C₂. Esta concentración es cercana o es más del doble del límite de detección instrumental, indicando que la extracción y la matriz influyen, por ejemplo, los resultados mostrados más adelante en el parámetro de recuperación exhiben que la cerveza tiene bajos porcentajes de recuperación, caso similar con los datos obtenidos en este parámetro, ya que la matriz de cerveza necesitó una concentración mayor para una eficiente detección de los analitos.

En jugo de manzana la concentración en donde se detectó e identificó todos los analitos con los criterios establecidos fue C₃. Esta concentración es cercana o es más del doble del límite de detección instrumental, indicando que la extracción y la matriz influyen.

Como se mencionó anteriormente, los límites de detección en diferentes matrices de los organofosforados de esta validación en otras investigaciones^{27,30,31,35,40,42} son más de una orden de magnitud menos que las obtenidas, esto debido a su enfoque en el área de alimentos o agua donde es necesario la identificación de estos a muy bajas concentraciones. Sin embargo, el objetivo fue lograr obtener límites de detección menores que la dosis letal media, que según lo mostrado en el Cuadro I acerca de su clasificación toxicológica, el analito con el menor LD50 es forato (2 mg/kg).

Si se toma como ejemplo una persona de 70 kg, se necesita 140 mg de forato en un litro (140 mg/L) para tener una dosis letal media que comparado con los límites de detección obtenidos en la matriz de cerveza (1.86 mg/L) y en la matriz de jugo de manzana (1.24 mg/L), el método es eficiente para la detección del analito en muestras reales.

5.2.2. Precisión intermedia

La precisión intermedia se evaluó con dos diferentes analistas, donde se les entregó el diagrama del procedimiento y cinco réplicas correspondientes de cada matriz a dos diferentes concentraciones: el doble del límite de detección por matriz y a una concentración de 5.00 mg/L. Además, se les entregó cinco réplicas como blanco de preparación, esto para evaluar si la técnica requiere de un entrenamiento del personal y la posibilidad de contaminación cruzada. Todas las réplicas fueron entregadas sin etiquetar la concentración.

Los resultados en cerveza se muestran en el siguiente cuadro, donde también se observa un tercer analista, pero sin la concentración de 5.00 mg/L ni los blancos de preparación.

Cuadro XXVI. Porcentajes de detección para los diferentes analistas en cerveza.

Analitos	Analista 1			Analista 2			Analista 3
	2*LD (%)	5.00 mg/L (%)	0.00 mg/L (%)	2*LD (%)	5.00 mg/L (%)	0.00 mg/L (%)	2*LD (%)
etoprofos	100	90	0	100	100	0	100
forato	100	100	0	0	100	0	100
diazinón	90	100	0	100	100	0	100
metilparatión	100	100	0	100	80	0	100
malatión	100	100	0	100	100	0	100
clorpirifós	100	100	0	100	100	0	100

El criterio de aceptación fue la detección de al menos un 80 % de las inyecciones de cada concentración en las dos matrices para ambos analistas. Como se mostró en los resultados de los extractos en cerveza, la mayor parte de los analitos en las diferentes concentraciones cumplen con el criterio, con excepción del forato para el segundo analista al doble del límite de detección. Por esta razón, se necesitó una tercera persona que realizara lo mismo a la concentración que no pasó el criterio, en donde se obtuvo un 100 % no solo en el analito en cuestión sino también en los demás.

Los resultados en jugo de manzana se muestran en el siguiente cuadro, donde también se observa un tercer analista, pero sin la concentración de 5.00 mg/L ni los blancos de preparación.

Cuadro XXVII. Porcentajes de detección para los diferentes analistas en jugo de manzana.

Analitos	Analista 1			Analista 2			Analista 3
	2*LD (%)	5.00 mg/L (%)	0.00 mg/L (%)	2*LD (%)	5.00 mg/L (%)	0.00 mg/L (%)	2*LD (%)
etoprofos	100	100	0	100	100	0	100
forato	100	100	0	100	100	0	100
diazinón	100	100	0	100	100	0	100
metilparatión	100	100	0	100	100	0	100
malatión	100	100	0	100	100	0	100
clorpirifós	90	100	0	100	100	0	100

Los resultados de los extractos en jugo de manzana muestran que todos los analitos cumplen con el criterio independientemente del analista o la concentración en la que se trabajó, sin embargo, para corroborar los resultados del doble del límite de detección se le entregó también a la tercera persona las réplicas correspondientes, demostrando un 100 % de detección.

Con este parámetro se verificó no solo el límite de detección y a una concentración de 5.00 mg/L, sino que también extracciones por diferentes personas sin presentar una contaminación cruzada, siempre y cuando se sigan las buenas prácticas de laboratorio. Además, se confirma la necesidad que el personal sea entrenado, esto porque el analista 2 no tenía previo entrenamiento no solo de la técnica, sino que tampoco del uso de micropipetas.

5.2.3. Estabilidad del extracto en bandeja de inyección

La evaluación de la estabilidad en la bandeja de inyección se realizó mediante una curva de calibración de cinco niveles extraídos en cada matriz, de la misma disolución resultante de los extractos se fraccionó y se agregó a diferentes viales de 2.00 mL con el fin de inyectarlos a las 0 h, 24 h, 48 h y 72 h. El criterio de aceptación para este parámetro fue la descomposición no mayor de un 20 % hasta las 72 horas y cumplir con los criterios de identificación según WADA¹⁵ acerca de los tiempos de retención y las intensidades relativas de los analitos.

Los resultados de la estabilidad de los extractos de la curva de calibración en cerveza se observan en la siguiente figura.

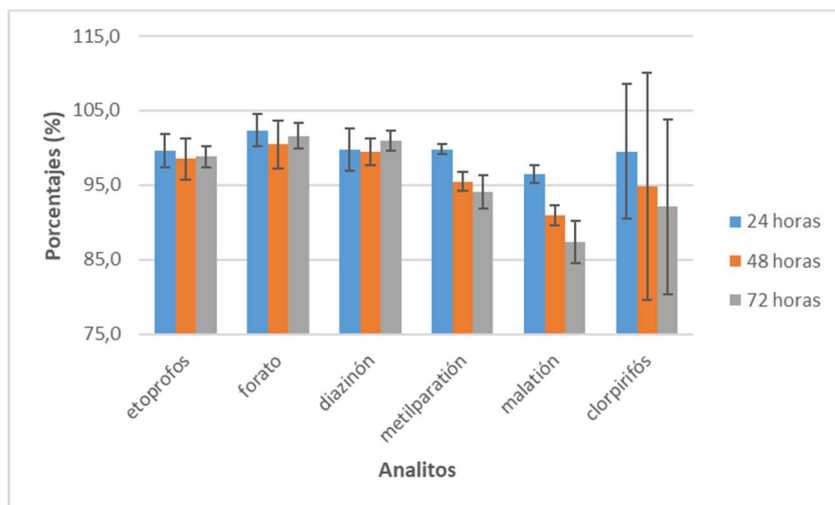


Figura 18. Promedio de las estabilidades de los extractos (2α , $n = 5$) en cerveza, de los analitos en la bandeja de inyección.

Como demuestran los resultados, los analitos son estables en la bandeja de inyección hasta las 72 horas en cerveza, sin embargo, se observa una mayor descomposición al pasar del tiempo en especial en metilparatión, malatión y clorpirifós. Esto es aceptable ya que la metodología es cualitativa. En todas las horas evaluadas se cumplió con los criterios de WADA del tiempo de retención y de las intensidades relativas de los iones de los analitos.

Los resultados de la estabilidad de los extractos de la curva de calibración en jugo de manzana se observan en la siguiente figura.

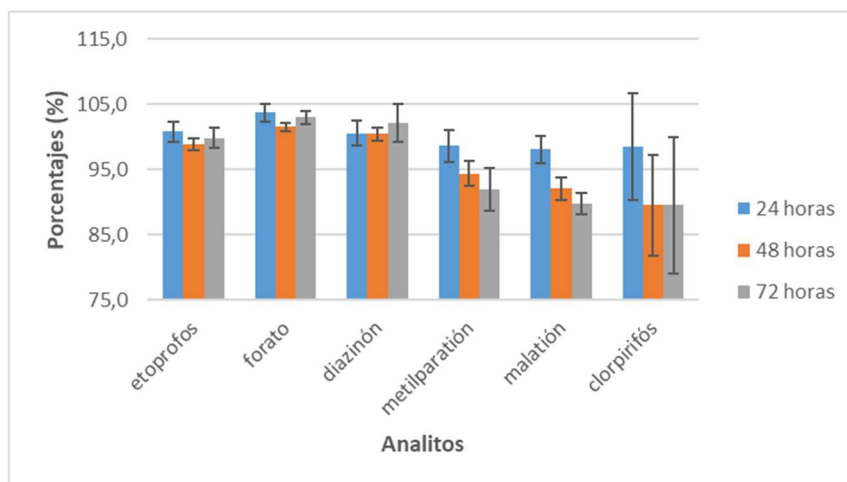


Figura 19. Promedio de las estabilidades de los extractos (2α , $n = 5$) en jugo de manzana, de los analitos en la bandeja de inyección.

Según los resultados, los analitos son estables en la bandeja de inyección hasta las 72 h en jugo de manzana, sin embargo, el clorpirifós con una concentración de 3.75 mg/L a las 72 h no cumplió con el criterio, aunque el promedio de las estabildades si cumplió. Además, al igual que los extractos en cerveza se observa una mayor descomposición al pasar del tiempo especialmente de metilparatión, malatión y clorpirifós. En todas las horas evaluadas se cumplió con los criterios de identificación.

Los resultados obtenidos en ambas matrices se asemejan a otros estudios donde igualmente los extractos se dejaron a temperatura ambiente o en el equipo hasta 48 h o 72 h, donde uno de los estudios planteó como criterio de aceptación una descomposición no más del 20 %.^{29,42,43} Una de las investigaciones demostró que el malatión, al igual que en la validación, presentaba una alta descomposición a las 72 h.⁴² Estos estudios mencionados se realizaron tanto en matrices como en concentraciones diferentes comparados a las de la validación, esto porque no es común encontrar investigaciones con estas características en el ámbito forense en muestras no biológicas.

Según los resultados de una investigación realizada por Racke en 1994, la temperatura del suelo afecta significativamente la tasa de degradación del clorpirifós, donde se puede hasta duplicar con cada aumento de 10 °C.⁹¹ Esto podría explicar el por qué la tendencia a recuperaciones menores para el clorpirifós en ambas matrices al estar en la bandeja de inyección. Si bien el cuarto donde se encuentra el cromatógrafo está con temperatura controlada a 21 °C, la cercanía de la bandeja con el puerto de inyección y la salida del aire del horno del cromatógrafo podría generar un microambiente no controlable de temperatura. La temperatura de este microambiente no se midió debido que es parte normal del trabajo de muestras que este efecto se presente. Adicionalmente, no solo son recuperaciones bajas, sino que son también no reproducibles, lo cual se evidencia por la mayor variabilidad en los resultados solo para el clorpirifós, ya que todas las extracciones permanecieron en el auto muestreador hasta por 72 horas.

Al tomar en cuenta que el tiempo de corrida cromatográfica es de 25 minutos, la cantidad de blancos instrumentales, los controles positivos, los controles negativos, las muestras (las cuales se extraen por duplicado) y que un ciclo de análisis de casos sospechosos es de hasta 48 h, el total de muestras a analizar es de al menos 22.

5.2.4. Estabilidad del extracto en refrigeración

La evaluación de la estabilidad del extracto en refrigeración se realizó mediante una curva de calibración de cinco niveles extraídos en cada matriz, de la misma disolución resultante de los extractos se fraccionó y se agregó a diferentes viales de 2.00 mL con el fin de inyectarlos a los ocho días y quince días después de la extracción, durante ese

tiempo fueron almacenados en una refrigeradora a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$. El criterio de aceptación para este parámetro fue la descomposición de un 20 % o menos hasta los 15 días y cumplir con los criterios WADA.

Los resultados de la estabilidad del extracto de la curva de calibración en cerveza se observan en la siguiente figura.

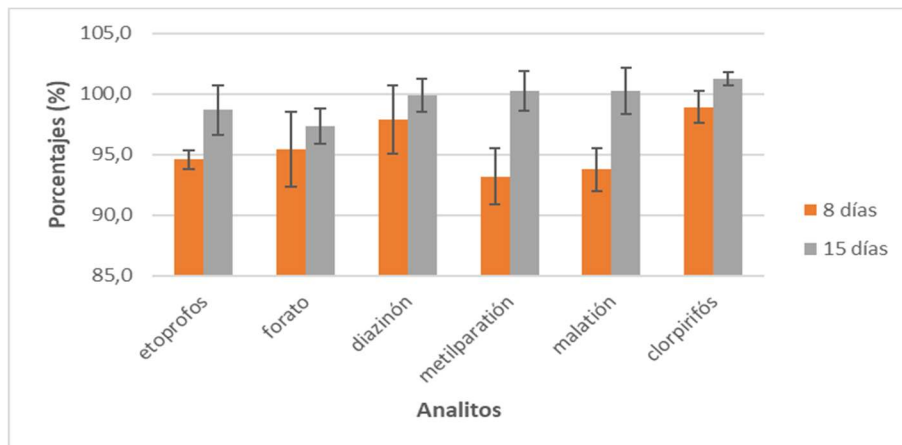


Figura 20. Promedio de las estabildades de los extractos (2α , $n = 5$) en cerveza, de los analitos en refrigeración.

Según los resultados mostrados en la Figura 20, los analitos son estables en refrigeración hasta los 15 días en cerveza y los que presentaban una mayor descomposición en la bandeja de inyección no presentan el mismo problema cuando se almacenan en refrigeradora, indicando que no es apto dejarlos en la bandeja del equipo. Todos los días evaluados cumplieron con los criterios de WADA del tiempo de retención y de las intensidades relativas de los iones de los analitos.

Los resultados de la estabilidad del extracto de la curva de calibración en jugo de manzana se observan en la siguiente figura.

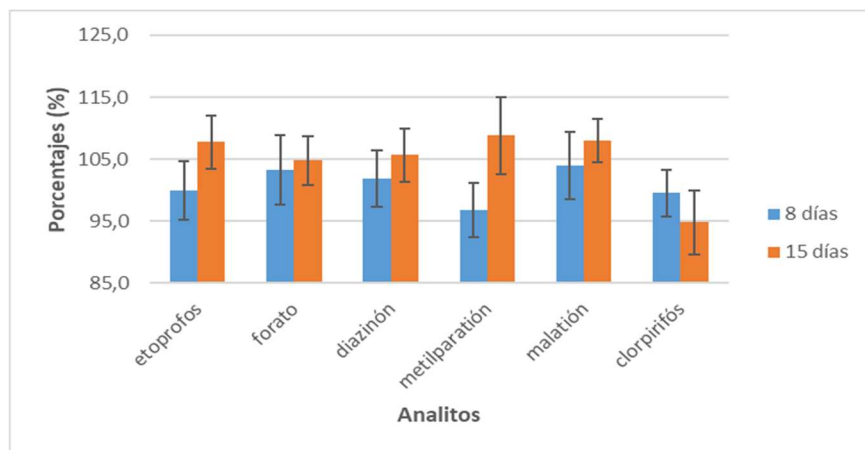


Figura 21. Promedio de las estabildades de los extractos (2α , $n = 5$) en jugo, de manzana de los analitos en refrigeración.

Según los resultados mostrados en la Figura 21, los analitos son estables en refrigeración hasta los 15 días en jugo de manzana y los que presentaban una mayor descomposición en la bandeja de inyección no presentaron el mismo problema cuando se almacenan en refrigeradora, indicando que son inestables al dejarlos a la temperatura que alcance la bandeja en el equipo. Todos los días evaluados cumplieron con los criterios de WADA del tiempo de retención y de las intensidades relativas de los iones de los analitos.

Si se comparan las desviaciones estándar de los resultados del clorpirifós para la estabilidad del extracto en bandeja de inyección contra las desviaciones estándar de los resultados del clorpirifós para la estabilidad en refrigeración observadas en los gráficos para cada matriz, se nota que hay un mayor rango de desviación para la primera estabilidad. Con esto se confirma que la temperatura afecta la degradación de este analito. Las variabilidades y los porcentajes de recuperación en refrigeración son similares para todos los analitos.

5.2.5. Eficiencia del método para la recuperación de los analitos y efecto matriz

Los cromatogramas en las matrices evaluadas se observan a continuación:

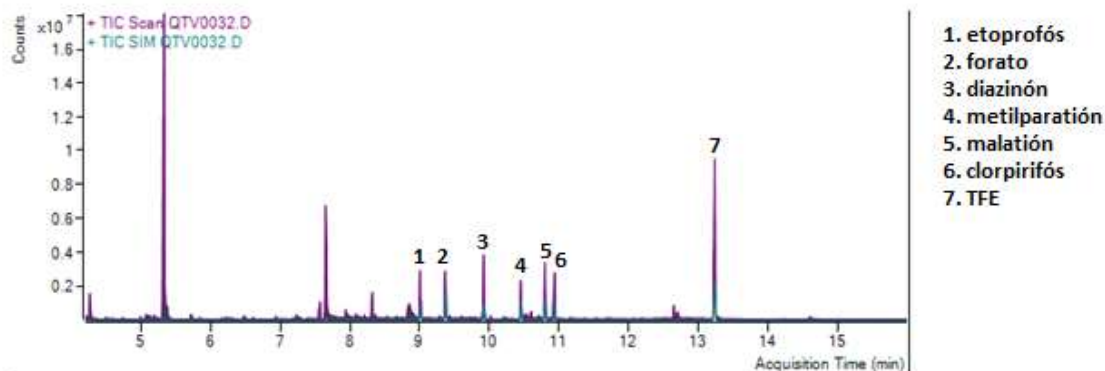


Figura 22. Cromatograma en SCAN del extracto de los analitos a 5.00 mg/L en cerveza.

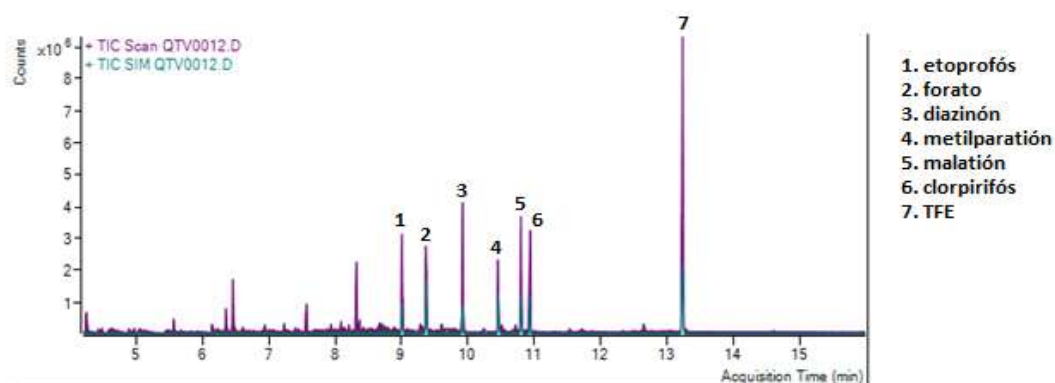


Figura 23. Cromatograma en SCAN del extracto de los analitos a 5.00 mg/L en jugo de manzana.

Como se observa en las Figuras 22 y 23, el método presenta selectividad entre los componentes de las respectivas matrices, lo cual se demuestra mayormente por la variabilidad de los iones calificadoros para los analitos en matriz con respecto a las variabilidades en disolvente (sin matriz). La metodología cromatográfica y de detección de espectrometría de relación masa/carga permite la identificación de los componentes de la matriz que no son eliminados por la técnica de extracción y limpieza.

Entre las sustancias mayoritarias que no son eliminadas por la técnica QuEChERS se logran caracterizar por comparación con la base de datos NIST, en el caso de la cerveza, el alcohol bencílico y el alcohol feniletílico y en el caso del jugo de manzana, el octanodiol y el ácido benzoico. La certeza en la caracterización de estas sustancias no es completa pues no se corroboró contra materiales de referencia. Lo importante es que la técnica cromatográfica presenta selectividad respecto a estas sustancias. La presencia de los alcoholes descritos en la cerveza se puede explicar por productos de la fermentación y el ácido benzoico en las bebidas de manzana por el preservante benzoato de sodio.

La detección de estas sustancias adicionales en las muestras cuestionadas podría ser de utilidad forense en un peritaje de comparación de muestras para establecer o descartar un origen común como un indicador cualitativo, por ejemplo, que la matriz cuestionada corresponde a cerveza o a una bebida. Claro está que esto requiere de estudios adicionales.

Los resultados del efecto matriz tanto en cerveza como en jugo de manzana se muestran en las siguientes figuras.

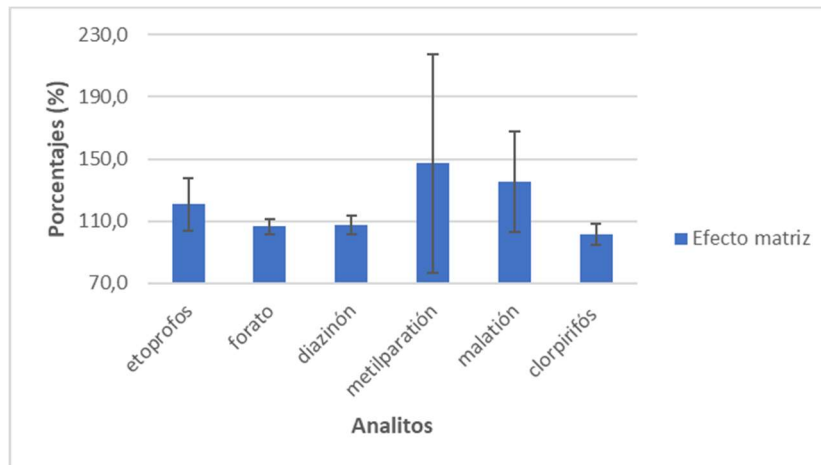


Figura 24. Efecto matriz en cerveza expresado como porcentaje de recuperación (2α , $n = 5$).

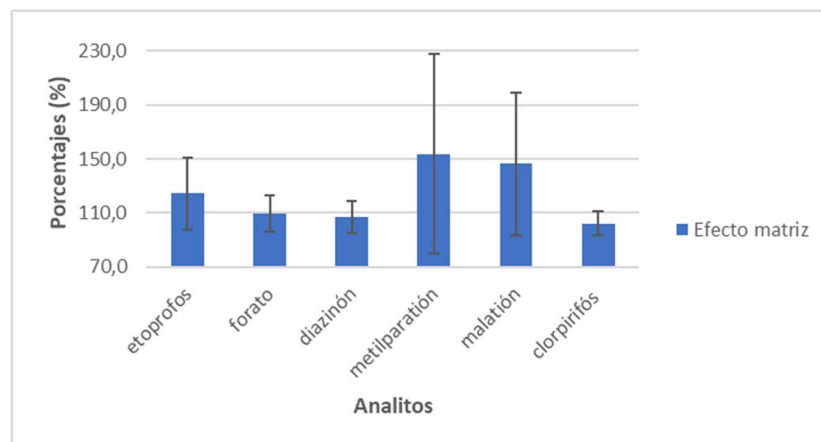


Figura 25. Promedio de los extractos de los analitos en jugo de manzana para el efecto matriz (2α , $n = 5$).

El efecto matriz depende de la naturaleza de los analitos (estabilidad térmica, volatilidad, polaridad, etc) y de su concentración. Para minimizar su efecto se han propuesto numerosos métodos como la limpieza exhaustiva de muestras, protectores de analitos,

factores de compensación y entre otros, pero normalmente se emplea calibraciones combinadas con matrices, como se realizó anteriormente para evaluar el efecto de la recuperación. Un efecto matriz del 100 % no indica influencia, pero si los resultados están fuera del ámbito de 80 % a 110 % muestran un efecto significativo, por lo que se toma como criterio de aceptación, además debe cumplir con los criterios WADA para la identificación de los analitos.^{92,93}

Las interferencias en la matriz es uno de los mayores problemas en la cuantificación ya que pueden suprimir o mejorar las señales cromatográficas, por ejemplo, valores menores del 100 % demuestran supresión y valores mayores del 100 % demuestran mejoramiento. Este efecto puede mostrar una baja o alta recuperación de los analitos.

Como muestran los resultados en las Figuras 24 y 25 para el efecto matriz, metilparatión y malatión en ambas matrices y etoprofós en jugo de manzana no cumplieron con el criterio de aceptación. Si se observan los resultados independientemente de la matriz, todos presentan un mejoramiento en la señal al ser mayores del 100 %. Esta situación es típica en cromatografía de gases, debido a un efecto de mejora por el bloqueo de sitios activos en la columna por componentes en la matriz, siendo así más partículas de los analitos llegarían al detector.⁹³

Para la presente metodología no es transcendental el efecto matriz observado ya que, al ser un análisis cualitativo, la caracterización del analito no se vio afectada por la presencia de impurezas que no se lograran remover con el método de extracción y que coeluyeran con el analito. Caso contrario para una metodología cuantitativa, ya que habría que evaluar si la presencia de impurezas o inclusive los otros analitos afectan la intensidad de la señal.^{92,93}

Para evaluar la eficiencia de recuperación se tomó como criterio de aceptación un ámbito entre el 85 % y el 110 %⁷⁵, además debe cumplir con los criterios WADA para la identificación de los analitos. Este parámetro se realizó al tomar en cuenta la curva de calibración preparada en matriz extraída, esto para minimizar el efecto matriz, y los extractos en las matrices correspondientes. La curva se realizó al extraer la matriz sin ser dopada con los analitos y del líquido obtenido se prepararon los niveles. Para cada nivel se preparó una réplica inyectada en el equipo por triplicado, esto según lo mencionado por el científico Usui en el 2012, donde demostró el efecto matriz en sus resultados.⁴⁸

Para la preparación de las extracciones en matriz se agregó primero la cerveza y luego la alícuota correspondiente para preparar el nivel deseado, por último, se mezclaba. Esto antes de empezar con la extracción como tal, cada nivel se preparó por triplicado. En la siguiente figura se observa la curva del forato el cual presentó el menor coeficiente de determinación con respecto a los demás analitos evaluados.

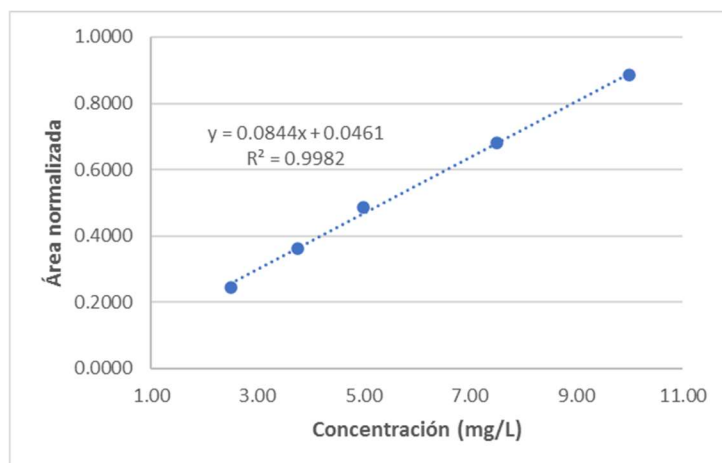


Figura 26. Curva de calibración de forato preparada con el extracto en cerveza sin dopar.

El criterio de aceptación de linealidad para la curva de calibración del extracto en cerveza fue un coeficiente de determinación no menor de 0.99 para todos los analitos.⁷⁸ Por lo que según lo mostrado en la figura anterior se cumple con el criterio.

Como se observa en los resultados de la siguiente figura, los diferentes niveles de concentración cumplen con el criterio de aceptación para evaluar la eficiencia de recuperación. Además, se obtuvieron coeficientes de variaciones menores a 1.9 % entre todos los niveles, demostrando reproducibilidad del método de extracción en la matriz de cerveza. También, se cumplió con los criterios de WADA¹⁵ del tiempo de retención y de las intensidades relativas de los iones, indicando que la metodología es apta para la detección de los analitos.

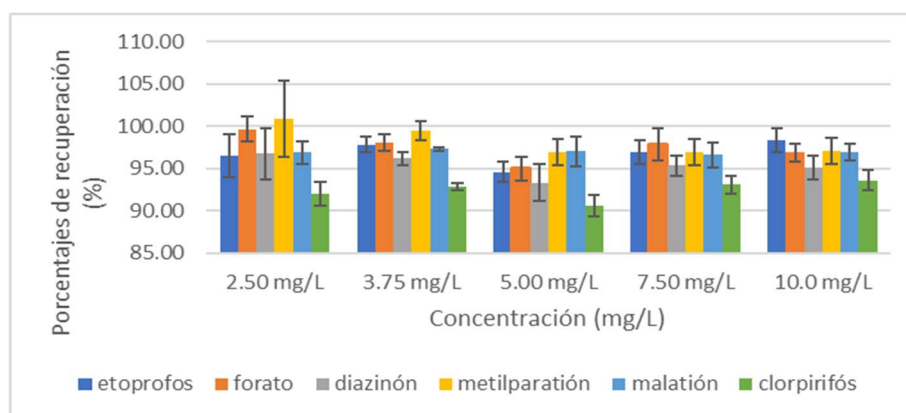


Figura 27. Porcentajes de recuperación (2σ , $n = 3$) de los extractos en cerveza de los analitos a diferentes concentraciones.

La curva de calibración que se realizó con el extracto en jugo de manzana se evaluó la misma manera que en cerveza, en la siguiente figura se observa la curva del malatión el cual presentó el menor coeficiente de determinación con respecto a los demás analitos evaluados.

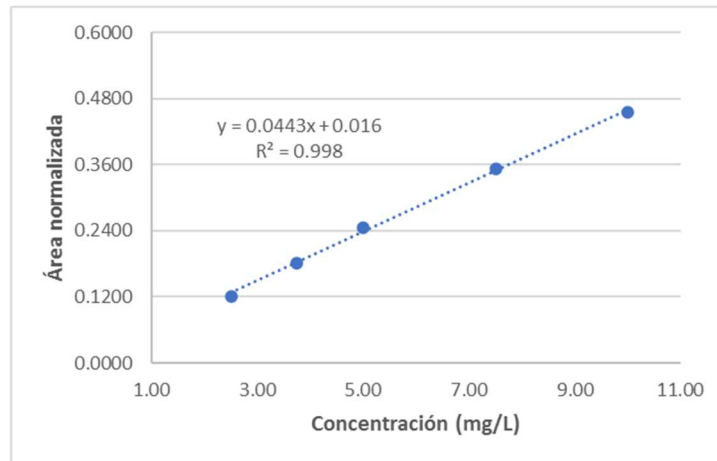


Figura 28. Curva de calibración de malatión preparada con el extracto en jugo de manzana sin dopar.

El criterio de aceptación de linealidad para la curva de calibración del extracto en jugo de manzana sin dopar fue un coeficiente de determinación no menor de 0.99 para todos los analitos.⁷⁸ Por lo que según lo mostrado en la figura anterior se cumple con el criterio.

Como se observa en la siguiente figura los diferentes niveles de concentración cumplen con el criterio de aceptación establecido para evaluar la eficiencia de recuperación. Además, se obtuvieron coeficientes de variaciones menores a 4.46 % entre todos los niveles, demostrando reproducibilidad del método de extracción en la matriz de jugo de manzana. También, se cumplió con los criterios de WADA¹⁵ del tiempo de retención y de las intensidades relativas de los iones, indicando que la metodología es apta para la detección de los analitos.

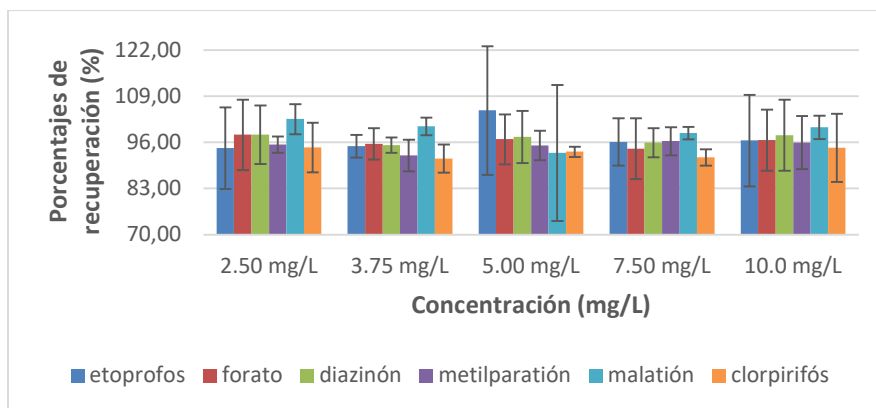


Figura 29. Porcentajes de recuperación (2α , $n = 3$) de los extractos en jugo de manzana de los analitos a diferentes concentraciones.

5.2.6. Robustez: efecto resinas del tubo d-SPE

El método QuEChERS plantea el uso de diferentes composiciones en la fase dispersiva para su aplicación en matrices de composición variada, por ejemplo, C18EN para matrices grasosas y GCB para matrices coloreadas. Por esta razón, se evaluaron las diferentes mezclas indicadas por el método para estudiar su efecto. El criterio de aceptación para este parámetro fue que el efecto de las resinas afectara la recuperación en un 20 % o menos⁷⁵ y que los analitos pasen los criterios de WADA¹⁵.

Las sales B (175 mg de la mezcla 19+1 y 25 mg de PSA), sales C (150 mg de $MgSO_4$ y 25 mg de PSA) y sales D (150 mg de $MgSO_4$ y 25 mg de PSA y 25 mg de C18) se evalúan con respecto a las sales A (175 mg de la mezcla 59+1 y 25 mg de PSA), esto porque estas últimas son las utilizadas para la validación. Se seleccionó las sales A ya que el C18 funciona mejor para grasas y lípidos, que en el caso de las matrices analizadas no es necesario, además, tanto la cerveza como el jugo de manzana presentaron un tono beige por lo que es importante el uso del GCB, sin embargo, no es esencial una mayor cantidad de este por la baja coloración presentes en las matrices.¹³

Los resultados del efecto de las resinas del tubo d-SPE de los extractos en cerveza y en jugo de manzana se observan en las siguientes figuras.

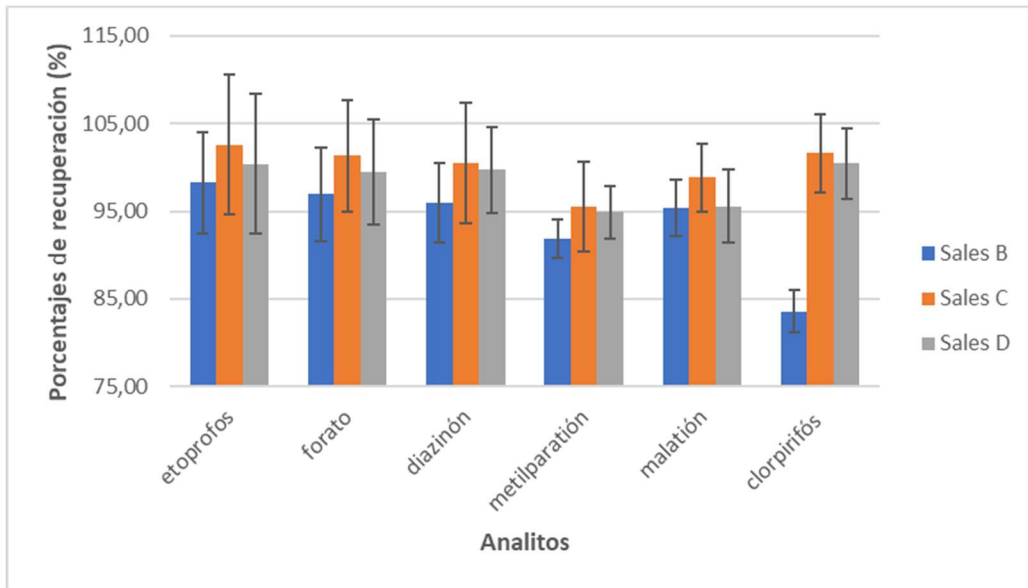


Figura 30. Porcentajes de recuperación (2α , $n = 6$) de los extractos en cerveza de los analitos en diferentes mezclas de resinas.

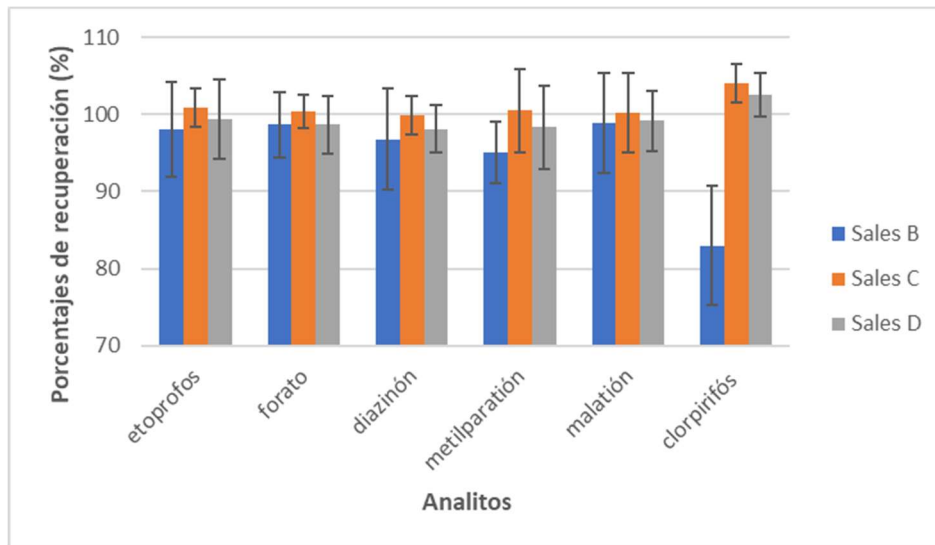


Figura 31. Porcentajes de recuperación (2α , $n = 6$) de los extractos en jugo de manzana de los analitos en diferentes mezclas de resinas.

Los resultados mostrados en la Figura 30 y en la Figura 31, demuestran que todas las resinas pasan el criterio de aceptación con respecto a la recuperación en ambas matrices, a excepción de una inyección duplicada en el equipo de una de las réplicas en las sales B para etoprofos en cerveza, donde no pasa el criterio WADA¹⁵ para uno de los iones. Entre las mezclas de resinas evaluadas la que presentó mayores porcentajes de

recuperación fueron las sales C, las cuales en lugar de GCB contienen C18. Es importante observar que de todos los resultados el clorpirifós presenta las más bajas recuperaciones independientemente de la matriz, siempre en las sales B donde hay mayor cantidad de GCB. Esto puede deberse a que el GCB tiene una afinidad por las estructuras planas, disminuyendo la extracción del analito¹³ y aunque el clorpirifós no tenga una estructura plana por completo es el único que presenta en su estructura un grupo aromático donde están enlazados halógenos y su grupo compuesto con fósforo, siendo suficiente para la afinidad mostrando bajas recuperaciones.

A pesar de que la validación está enfocada en cerveza y jugo de manzana, es común a nivel forense recibir indicios en diferentes tipos de matrices desde comidas, recipientes de plaguicidas o bebidas, siendo esta última la más común. Por esta razón, se vuelve importante conocer los resultados de este parámetro, porque al tomar en cuenta las características de la matriz como cantidad de grasa, coloración o carbohidratos, se puede elegir el tipo o proporciones de las sales a utilizar.

Por ejemplo, con una muestra muy coloreada es ideal utilizar para la fase dispersiva una alta cantidad de GCB, para ceras es ideal C18 y para azúcares o ácidos grasos es bueno el PSA, todo depende del tipo de matriz en la que se esté trabajando. Volviéndose importante la evaluación de las diferentes sales para asegurarse de que ninguna afecte los analitos como lo puede hacer el GCB con analitos de estructura plana.¹³

5.2.7. Veracidad

El parámetro de veracidad es importante porque se puede comparar los resultados del método QuEChERS EN15662:2008 oficial, el método QuEChERS EN15662:2008 modificado y el método sin las modificaciones realizadas. Es importante mencionar que además de las modificaciones ya descritas anteriormente en la extracción, el método oficial utiliza un equipo GC/MSD con PTV y/o un LC-MS/MS e identifica los analitos a nivel de residuos en frutas y verduras. El criterio de aceptación para este parámetro fue un porcentaje de exactitud del 85 % o mayor.

Los extractos por ambos métodos no mostraron problemas a la hora de realizar el procedimiento y en ambos casos el tono intenso de las fresas fue absorbido por el carbón grafitizado.

En el siguiente cuadro se encuentran los resultados de las recuperaciones que obtuvieron en la validación del método oficial QuEChERS EN15662:2008 para el parámetro de recuperación por los Laboratorios Comunitarios de Referencia para Plaguicidas de la Unión Europea (EURLs, siglas en inglés).¹³

Cuadro XXVIII. Recuperaciones e intervalos de confianza (IC) obtenidas del método QuEChERS oficial, modificado y los resultados reportados del método QuEChERS.¹³

Analitos	Recuperación del método modificado (IC)	Recuperación obtenida, aplicando el método oficial (IC)	Recuperación reportada en el método oficial (IC)
etoprofos	100.9 % (1.5)	103.0 % (1.4)	100 %
forato	102.2 % (1.5)	105.7 % (1.3)	91 %
diazinón	98.3 % (1.7)	99.1 % (1.2)	101 %
metilparatión	111.7 % (1.5)	111.5 % (1.8)	99 %
malatión	107.4 % (1.2)	104.7 % (1.2)	101 %
clorpirifós	79.1 % (1.9)	83.5 % (3.0)	101 %

Para comparar los resultados y mostrar si hay diferencias significativas entre las recuperaciones del método modificado, las recuperaciones del método oficial y los resultados reportados por los Laboratorios Comunitarios de Referencia para Plaguicidas de la Unión Europea, se realizó una prueba t con un 95 % de confianza. En el siguiente cuadro se muestran los resultados.

Cuadro XXIX. Resultados de los sesgos para los diferentes métodos.

Analitos	Sesgo del método modificado contra lo reportado según EURLs (%)	Sesgo del método oficial contra lo reportado según EURLs (%)
etoprofos	+0.90	+3.0*
forato	+11.2*	+14.7*
diazinón	-2.7*	-1.9*
metilparatión	+12.7*	+12.5*
malatión	+6.4*	+3.7*
clorpirifós	-21.9*	-17.5*

*diferencia significativa al 95 % de confianza

El valor teórico de t es de 2.26.⁸⁵ Si se observan los resultados solo la comparación de etoprofos del método modificado contra lo reportado según EURLs¹³ no presenta dicha diferencia, caso contrario del resto de analitos.

Estas diferencias se pueden deber a que no solo se realizó un escalamiento de la técnica, sino que se trabajó en otras matrices, con niveles de concentración y un equipo cromatográfico diferentes. Sin embargo, es importante mencionar que es un método cualitativo y ha demostrado que cumple con los requerimientos establecidos.

Además, no todas las diferencias representan que el método no es apto, esto porque si se observan los sesgos en donde la mayoría son positivos significa que el método aplicado obtuvo mayor recuperación contra lo reportado por EURLs.¹³

Una investigación realizada donde modificaron el procedimiento de QuEChERS y añadieron el uso de nanopartículas magnéticas utilizando fresas como matriz, obtuvieron recuperaciones de analitos organofosforados alrededor del 93 %, ⁹⁴ siendo este resultado similar a lo obtenido en las recuperaciones del método modificado de QuEChERS validado utilizando igualmente fresas como matriz.

5.3. Evaluación del desempeño de la metodología validada en matrices diferentes de cervezas y jugos de manzana de acuerdo con los criterios de Horwitz y a los criterios de Westgard y el efecto de las diferentes concentraciones de etanol en cerveza dopada

5.3.1. Rugosidad

El criterio de aceptación fue entre el 85 % y el 110 % de porcentaje de recuperación⁷⁵ de cada analito para cada matriz y que los analitos pasen los criterios de WADA.¹⁵

La Figura 32 a. presenta matrices con fuertes tonalidades, las cuales no se observan en la Figura 32 b., indicando que el carbón grafitizado cumplió el objetivo de absorber las sustancias que generan coloración, como lo son las maltas. Para las extracciones en las diferentes cervezas no se tuvo ningún problema o particularidad.

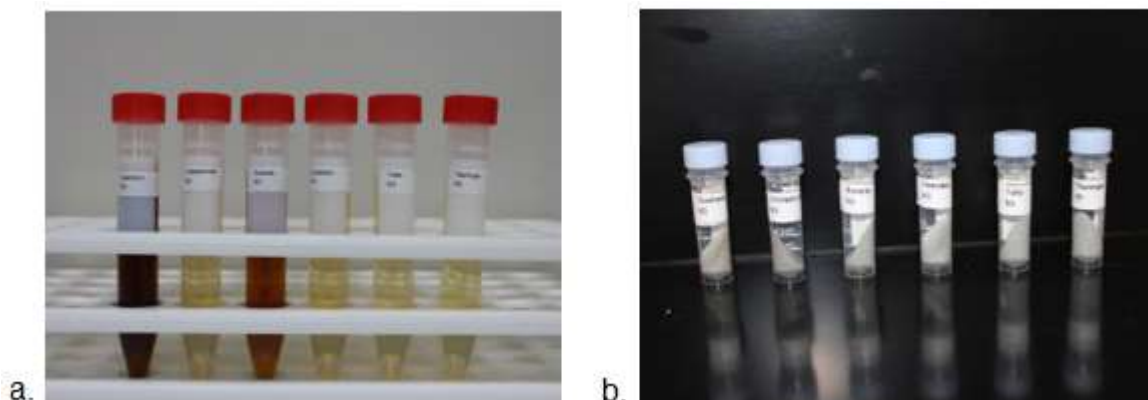


Figura 32. En la figura a. se muestran las matrices de cerveza antes de la extracción y en la figura b. en el mismo orden las matrices después de la extracción.

Los resultados de la rugosidad en las diferentes marcas de cervezas se encuentran en la siguiente figura.

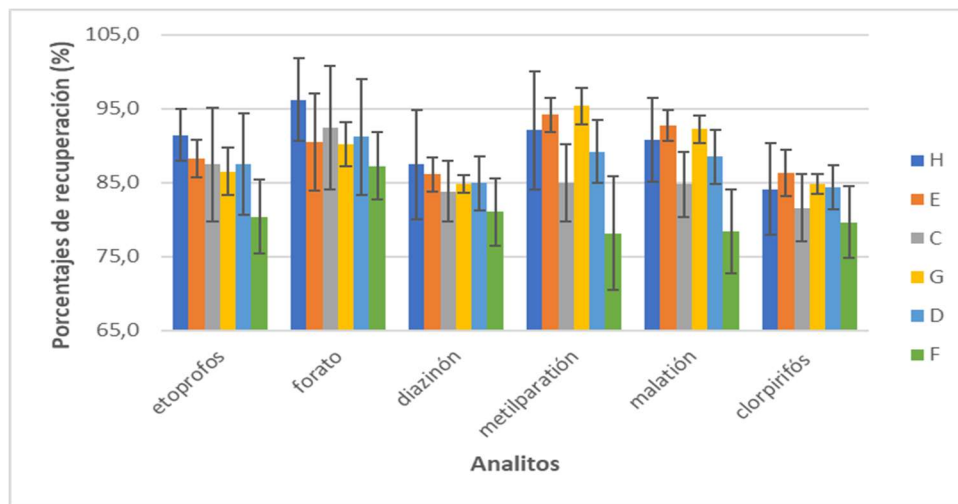


Figura 33. Porcentajes de recuperación (2α , $n = 6$) en diferentes marcas de cerveza a una concentración de 3.75 mg/L de los analitos.

Si se observan los resultados mostrados en la Figura 33, la cerveza codificada como F no cumple con el criterio establecido, a excepción de forato, esto debido al alto contenido de alcohol, caso contrario de las cervezas con código de identificación E y G donde todos los analitos cumplieron el criterio de aceptación.

Si se analizan los resultados con respecto a los analitos, clorpirifós solo cumplió el criterio de aceptación en las cervezas de código E y G, caso contrario de forato el cual cumplió el criterio de aceptación en todas las cervezas.

Según los resultados no todas las marcas de cervezas utilizadas presentan altos porcentajes de recuperación de los analitos, sin embargo, el porcentaje de alcohol puede ser una interferencia significativa. Esto indica que, aunque se extraiga una muestra en alguna cerveza, no significa que la metodología funcione de la misma manera que con la cerveza seleccionada para la validación ya que cada una de estas contienen diferentes ingredientes, proporciones de estos o tonalidades. Por esta razón es importante la validación de cada matriz y en caso de encontrarse una interferencia que afecta el análisis del analito se puede utilizar algún agente enmascarante que inactiva la interferencia.⁵⁹

La Figura 34 a. presenta matrices de diferentes jugos de manzana con leves tonalidades, sin embargo, en la penúltima de código D se observó un líquido blanco que cuando se realizó la extracción presentó problemas en la separación de las fases, dificultando el

traspaso del líquido sobrenadante. La Figura 34 b. presenta los tubos d-SPE sin tonalidades.

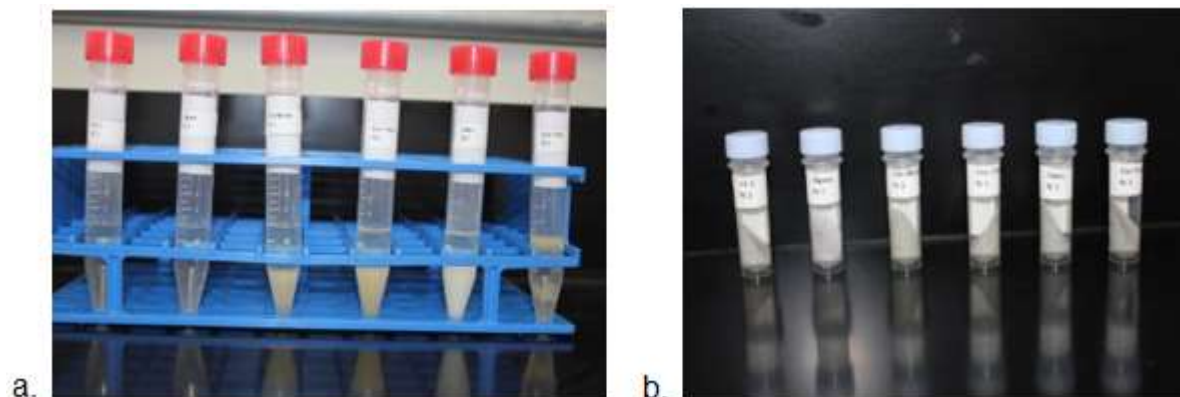


Figura 34. En la figura a. se muestran las matrices de bebidas de manzana antes de la extracción y en la figura b. en el mismo orden las matrices después de la extracción.

Los criterios fueron los mismo que los aplicados en las diferentes marcas de cerveza. Los resultados de la rugosidad en seis diferentes marcas de jugos de manzana se encuentran en la siguiente figura.

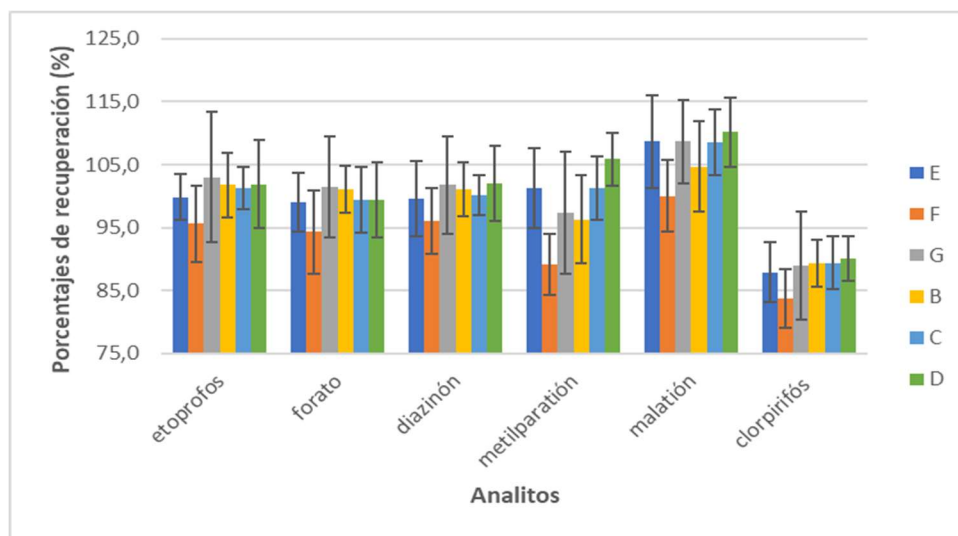


Figura 35. Porcentajes de recuperación (2α , $n = 6$) en diferentes marcas de jugo de manzana a una concentración de 3.75 mg/L de los analitos.

Si se observan los resultados de cada marca de jugo de manzana, la muestra codificada como F es la única donde uno de los analitos (clorpirifós) no cumple el criterio establecido. Esto demuestra que, a pesar de las diferencias entre los distintos jugos de manzana se

obtuvieron muy buenos resultados de la recuperación de los analitos indicando que aún en estas otras marcas se pueden extraer, sin la duda de no lograr detectar la sustancia.

Además, es importante destacar que la bebida con manzana con código D, la cual contenía soja, presentó turbidez en los extractos no se vieron afectados los porcentajes de recuperación. La turbidez podría asociarse a la presencia de las proteínas de la soja en la matriz que son insolubles en las fases acuosa y orgánica

De manera general, el clorpirifós fue el analito que presentó los menores porcentajes de recuperación tanto en las diferentes cervezas como en los diferentes jugos de manzana, siendo esta tendencia similar a la observada en los porcentajes de recuperación obtenidos en la cerveza y en el jugo de manzana utilizados en la validación. En comparación con las diferentes marcas de cerveza, las marcas de jugo de manzana muestran muy buenas recuperaciones. Para analizar de manera gráfica los resultados y así determinar el desempeño de la metodología en las diferentes matrices se utilizó el criterio de Horwitz y el criterio de Westgard.^{77,78}

Cada matriz se evaluó con dos criterios diferentes según el valor del porcentaje de sesgo, recomendado por el investigador Sagrado en el año 2005, donde depende de la concentración utilizada en la extracción que según lo realizado para este parámetro fue de 3.75 mg/L de los analitos, por lo que permite una recuperación entre un 80 % y 110 %. Si en los resultados se obtiene una recuperación menor del 100 % el porcentaje de sesgo utilizado para el gráfico es de un 20 % pero si más bien fue mayor del 100 %, se utiliza un 10 %.

El otro criterio utilizado fue de un sesgo del 30 %, este último aplicado porque a laboratorios forenses cualitativos le interesan no solo la detección, sino que también la identificación de los analitos, siendo así, aunque no se tengan excelentes recuperaciones, si los tiempos de retención y las intensidades de los analitos pasen los criterios establecidos es una sustancia identificada, siendo el principal objetivo.

En las siguientes figuras se observan el desempeño de la metodología según Westgard en diferentes marcas de cerveza con el porcentaje de sesgo de 20 % recomendado por Sagrado.⁷⁵ para metodologías cuantitativas y de un 30 % que se considera que es un sesgo aceptable dato que la metodología desarrollada es de aplicación cualitativa.

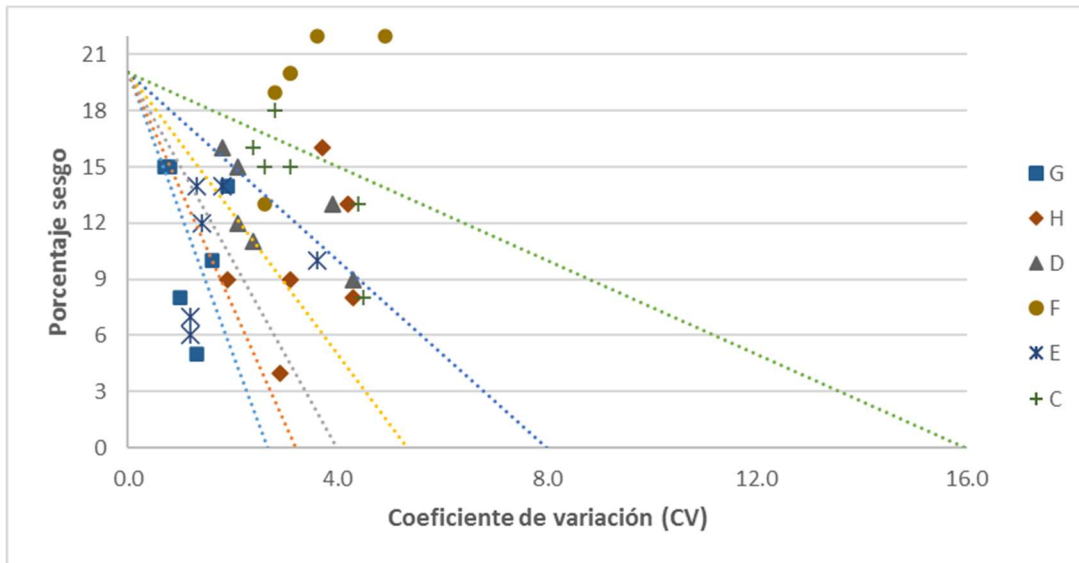


Figura 36. Valoración del desempeño de la metodología QuEChERS según Westgard en diferentes marcas de cerveza con un porcentaje de sesgo del 20 %.

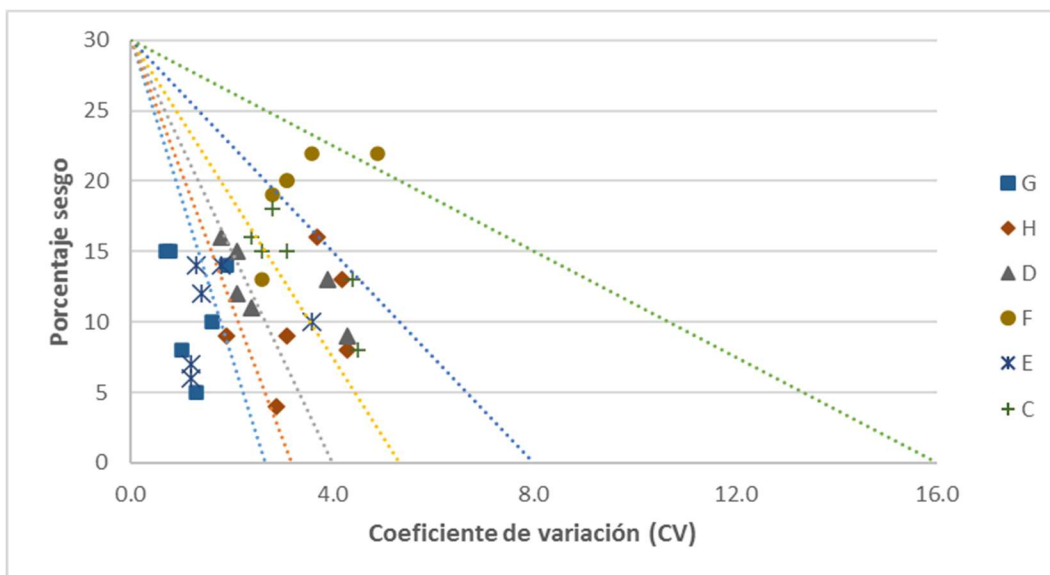


Figura 37. Valoración del desempeño de la metodología QuEChERS según Westgard en diferentes marcas de cerveza con un porcentaje de sesgo del 30 %.

Como se observa en la Figura 36, la mayoría de los símbolos que representan analitos extraídos de las matrices de cerveza con código F y C muestran un desempeño inaceptable, caso contrario con la de código G que muestra en su mayoría un desempeño entre clase mundial y excelente. La mayor parte de las diferentes marcas de cerveza muestran un rendimiento desde clase mundial a pobre, esto indica que la metodología de

extracción no es tan eficiente en las diferentes marcas ni en los analitos, ya que una misma marca puede indicar que los analitos son extraídos con eficiencias distintas como por ejemplo la de código H.

En la Figura 37, la cerveza de código F muestra la misma tendencia que en la Figura 36 acerca de presentar un desempeño inaceptable, mientras que las de código G y E indicaron un desempeño entre clase mundial y bueno. Además, al igual que en la Figura 36 la mayor parte de las distintas marcas de cervezas muestran un rendimiento de clase mundial a pobre.

Si se observan las Figuras 36 y 37, se nota que la mayoría de los símbolos se encuentran en la parte superior, indicando una mala recuperación que a la vez se ve reflejada en los resultados de los porcentajes de extracción. Además, el metilparatión en al menos un duplicado de las réplicas de las cervezas de código G, F, C y E no cumplieron con el criterio de WADA¹⁵ acerca de las intensidades relativas. La misma situación se presentó con forato en las de código F y C, y con etoprofos en la muestra E.

En las siguientes figuras se observan el desempeño de la metodología según Westgard en diferentes marcas de jugo de manzana con el porcentaje de sesgo recomendado por Sagrado del 10 % y 20 %, dependiendo de la recuperación obtenida y por laboratorios forenses cualitativos, respectivamente.⁷⁵

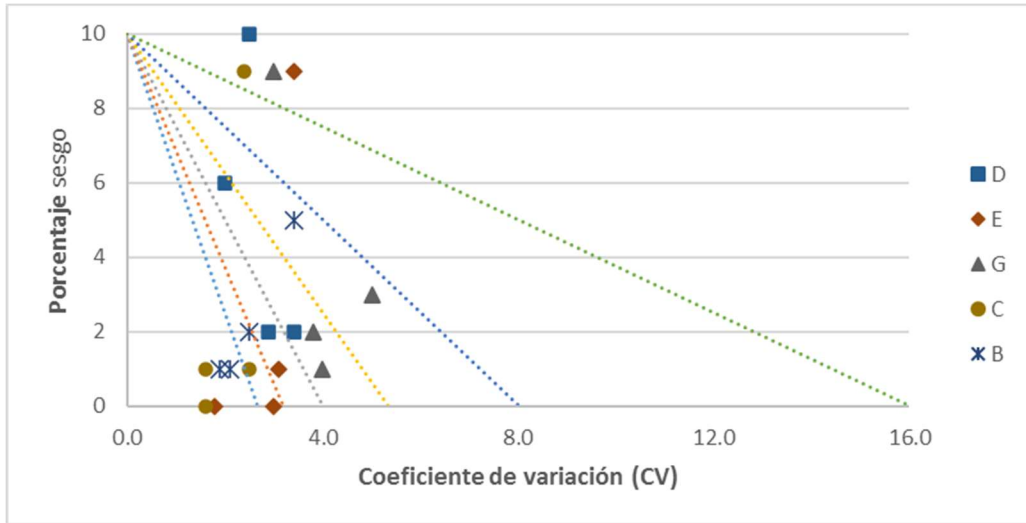


Figura 38. Valoración del desempeño de la metodología QuEChERS según Westgard en diferentes marcas de jugo de manzana con un porcentaje de sesgo del 10 %.

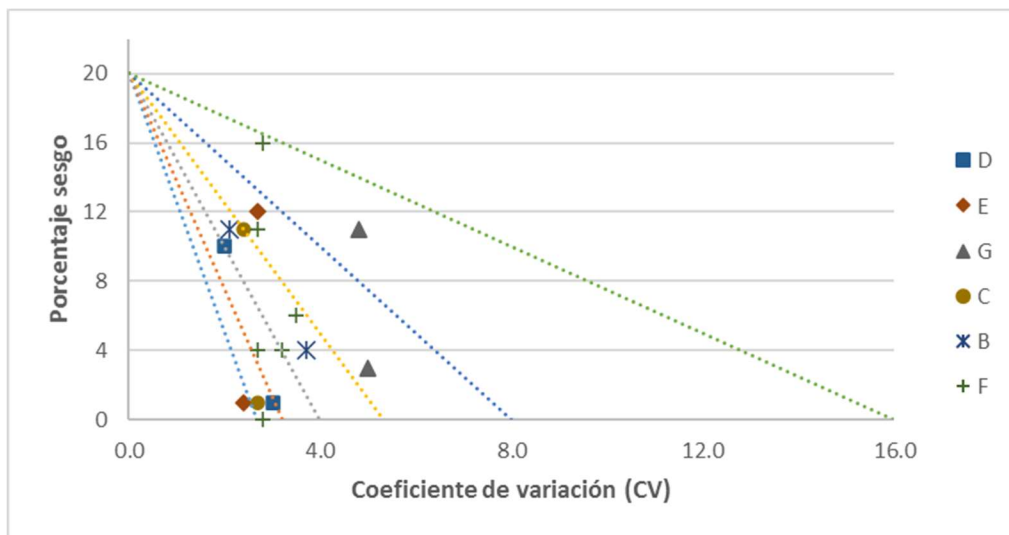


Figura 39. Valoración del desempeño de la metodología QuEChERS según Westgard en diferentes marcas de jugo de manzana con un porcentaje de sesgo del 20 %.

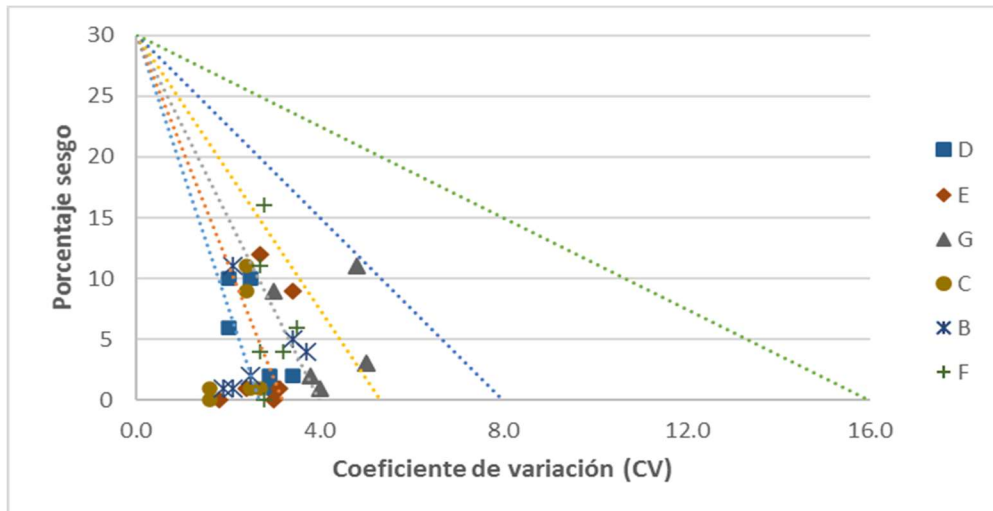


Figura 40. Valoración del desempeño de la metodología QuEChERS según Westgard en diferentes marcas de jugo de manzana con un porcentaje de sesgo del 30 %.

En la Figura 38 los resultados demuestran que para los distintos jugos de manzana se obtuvo que la metodología es entre clase mundial y pobre, a excepción de unos símbolos en la parte superior que indican que es inaceptable, las cuales todas representan al malatión. Por lo que se considera que la extracción del malatión en las diferentes marcas de jugo de manzana no es eficiente.

En la Figura 39 se observan solo dos símbolos por marca de jugo de manzana a excepción de la de código F, el cual tiene las seis figuras, ya que todos los analitos mostraron recuperaciones menores del 100 %. Con estos resultados se puede indicar que el desempeño de la metodología fue desde clase mundial hasta inaceptable.

En la Figura 40 en el cual se evalúan los distintos jugos con el criterio de laboratorios forenses cualitativos, el desempeño de la metodología resulta desde clase mundial hasta pobre, aunque en su mayoría no pasa de ser marginal.

Todos los analitos en las distintas marcas evaluadas de jugos de manzana pasaron los criterios WADA¹⁵ acerca de las intensidades relativas de los iones, con excepción de metilparatión en un duplicado de una réplica de las extracciones con código B. Si se analizan los resultados de los criterios WADA¹⁵ para las marcas de cervezas con las marcas de jugos de manzana, se puede considerar que el metilparatión es un analito que puede presentar problemas de identificación en otras matrices en las que no esté validado.

Si se analizan los resultados de las figuras anteriores, hay una relación entre los porcentajes de recuperación mostrados y el cumplimiento del criterio WADA¹⁵ acerca de

las intensidades relativas de los iones, esto porque las distintas cervezas que mostraron bajas recuperaciones fueron las que presentaron la mayor cantidad de analitos que no pasaron el criterio WADA¹⁵ en comparación con las diferentes marcas de jugos de manzana, en las que se obtuvieron altas recuperaciones. Si se comparan los resultados entre las Figuras 36, 38 y 39 donde se utiliza el porcentaje de sesgo según Sagrado en el 2005, contra las Figuras 37 y 40 con un porcentaje de sesgo que puede ser utilizado por laboratorios forenses cualitativos, se observan mejores resultados con el último criterio esto porque permite mayor porcentaje de sesgo, atrayendo los símbolos hacia el lado izquierdo del gráfico, el cual es lo que se espera para un buen desempeño de una metodología.

Los datos de los porcentajes de recuperación junto con los gráficos de Westgard para evaluar el desempeño de la metodología QuEChERS, se puede afirmar que, aunque se realicen extracciones con el mismo tipo de matriz evaluada en la validación (cerveza y jugo de manzana), estos pueden variar en ingredientes, proporciones y entre otros, los cuales pueden interferir con los porcentajes de recuperación y, por ende, con la identificación de los analitos según el criterio de WADA.

Se buscaron investigaciones que hayan trabajado con los analitos de la validación en matrices similares, el cual el más cercano era el agua, sin embargo, no contiene los componentes de las matrices utilizadas en este estudio (azúcares, color, ente otros), por lo que las recuperaciones obtenidas fueron aceptables. Como se mencionó anteriormente es indispensable en especial en métodos cuantitativos la validación de todas las matrices para evaluar si contienen sustancias que puedan interferir en la detección de los analitos,⁵⁹ lo cual se comprobó en la presente validación ya que a pesar de ser matrices similares sus diferencias afectan los porcentajes de recuperación.

5.3.2. Robustez: efecto etanol

El criterio de aceptación para este parámetro fue que el etanol afectara la recuperación en un 20 % o menos y que todas las extracciones cumplieran con los criterios WADA del tiempo de retención y de las intensidades relativas de los iones.

Los resultados de la robustez en diferentes porcentajes de etanol se encuentran en la siguiente figura.

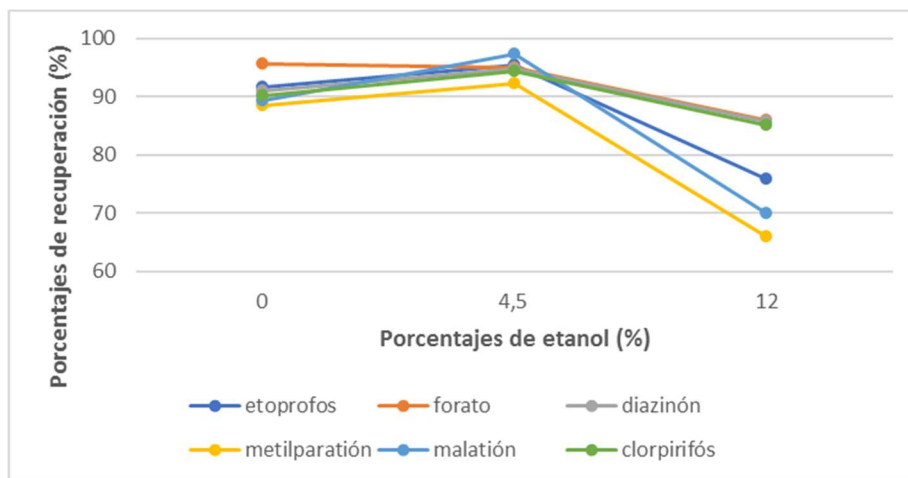


Figura 41. Porcentaje de recuperación del etanol en los diferentes analitos estudiados.

Como se observa en los resultados de la Figura 41, una cerveza hasta con un 4.5 % de etanol pasa el criterio de aceptación de recuperación. Sin embargo, con un 12 % de etanol se aprecia que etoprofos, metilparatión y malatión no pasa el criterio de la recuperación lo cual puede ser debido a que son más afectados que el resto de los analitos. Todos los resultados pasan los criterios WADA.¹⁵

Con los porcentajes de recuperación obtenidos se puede predecir que con cervezas u otras matrices con altos contenidos de etanol pueden presentar peores porcentajes comprometiendo la detección de los analitos.

En las siguientes figuras se observan el desempeño de la metodología según Westgard en diferentes porcentajes de etanol con un porcentaje recomendado por Sagrado en el año 2005, luego por un porcentaje de sesgo que puede ser utilizado para laboratorios forenses cualitativos, respectivamente.⁷⁸

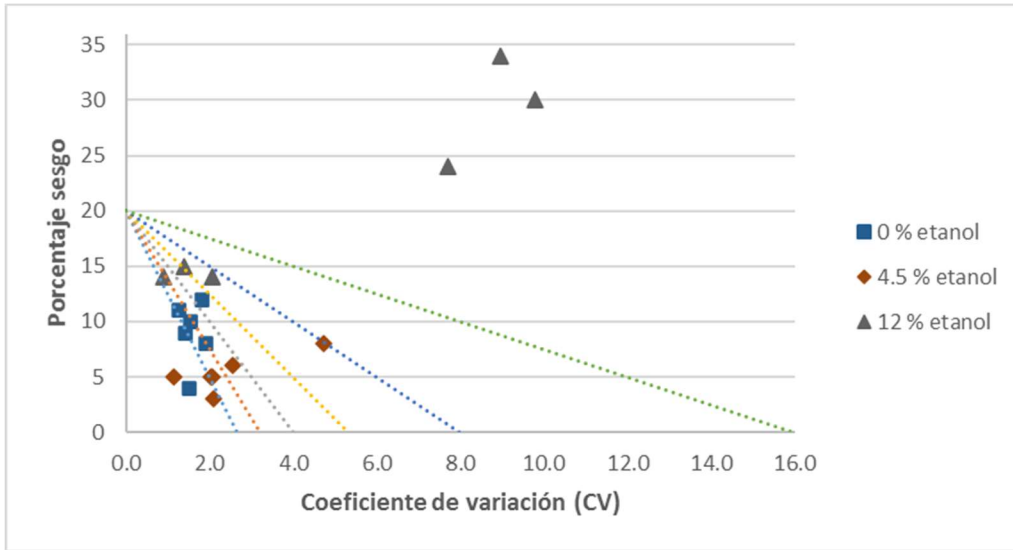


Figura 42. Valoración del desempeño de la metodología QuEChERS según Westgard a diferentes porcentajes de etanol con un porcentaje de riesgo del 20 %.

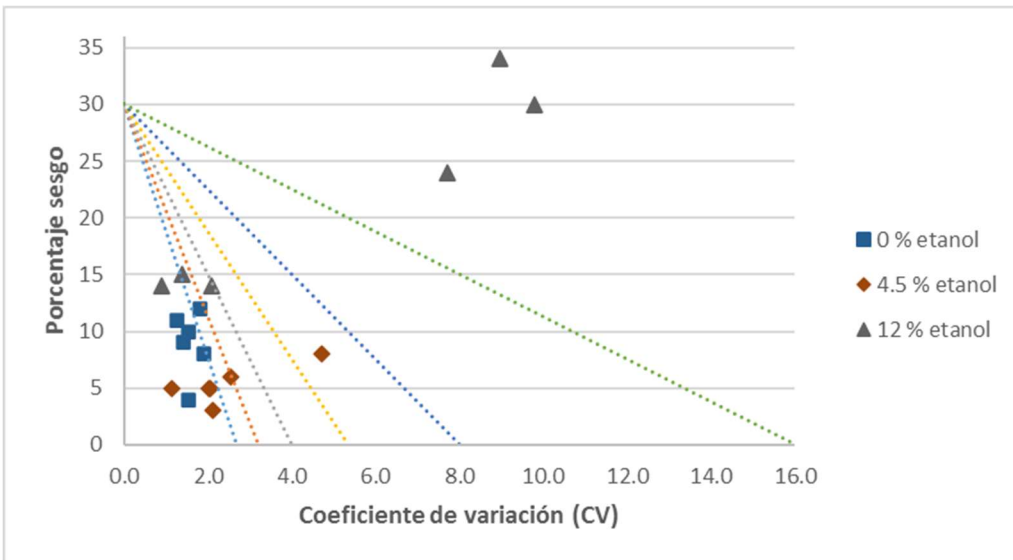


Figura 43. Valoración del desempeño de la metodología QuEChERS según Westgard a diferentes porcentajes de etanol con un porcentaje de riesgo del 30 %.

En las Figuras 42 y 43 se observan que tres analitos en la matriz con un 12 % de etanol la metodología es inaceptable, concordando con los resultados de los porcentajes de recuperación. Para el resto de los analitos la metodología señala ser desde clase mundial a pobre. Sin embargo, independientemente del porcentaje de etanol utilizado, los criterios de identificación cumplen con lo establecido. Siendo así, a pesar de no presentar buenos

porcentajes de recuperación con altas concentraciones de etanol cumple con la identificación de los analitos, lo cual es importante para una metodología cualitativa.

Una investigación del científico Nasiri en el 2021 acerca de la extracción de plaguicidas organofosforados con alcohol polivinílico, recubriendo partículas magnéticas de grafeno, demostró que dicho alcohol que contiene un grupo hidroxilo en una unidad del monómero presentaba mejores propiedades de adsorción si se comparaban los resultados de la extracción de los organofosforados con las partículas magnéticas de grafeno con y sin el alcohol.⁹⁵

Además, comprobaron el efecto del pH sobre la eficiencia de la extracción, concluyendo que a pH 6 los grupos funcionales de los organofosforados y el adsorbente están disociados, provocando una fuerte interacción entre ellos, y mejorando la eficiencia de la extracción. Por lo anterior, es que se ha utilizado un pH de 6 en otros estudios posteriores.⁹⁵

En el método de QuEChERS en la segunda etapa de extracción donde se utiliza un buffer de citratos, el pH de dicha disolución se encuentra ente 5.0 y 5.5.¹³ Tomando en cuenta los resultados mostrados por la investigación mencionada y los resultados de la validación donde el pH es cercano a 6 en una de las etapas y que al aumentar el porcentaje de alcohol en la matriz los porcentajes de recuperación de los analitos disminuyen, se considera la posibilidad que el etanol adsorba los organofosforados y que por esta razón no se estén extrayendo o identificando la totalidad de los analitos de la validación.

Capítulo 6. Conclusiones y recomendaciones

Los cambios realizados en los parámetros instrumentales, fundamentados en lo encontrado en la literatura o recomendaciones de la casa Agilent, mostraron un mejor rendimiento de la metodología cromatográfica y de detección, ya que no se observó en los resultados de los diferentes estándares internos o en los analitos un efecto memoria. Además, la resolución de estos no se vio afectada de manera que coeluyeran entre ellos, indicando que el método cromatográfico modificado es apto para los plaguicidas organofosforados evaluados.

La selección de los iones principales mostró que estos además de cumplir con las recomendaciones de WADA¹⁵ y AGILENT⁸³ acerca de sus características, mostraron repetibilidad adecuada, confirmando que su elección es correcta, ya que si hubieran expuesto lo contrario no pasarían los criterios de identificación acerca de las intensidades relativas de los iones. Además, se confirma lo recomendado por WADA¹⁵ acerca de no evaluar una muestra contra una curva de calibración obtenidas en diferentes secuencias, esto porque no se obtuvo reproducibilidad en uno de los iones de los analitos.

Las diferentes estabilidades como la disolución refrigerada de los analitos y la estabilidad de los extractos en las diferentes matrices en la bandeja de inyección y en refrigeración mostraron que la disolución intermedia puede almacenarse por al menos 6 meses sin descomposición mayor del 20 %⁷⁵ o que no cumpliera con el criterio WADA¹⁵, los extractos en la bandeja de inyección pueden estar por hasta 72 h y los extractos en refrigeración por 15 días sin afectar los criterios de identificación.

No hay necesidad de preparar constantemente la disolución intermedia de los analitos, que las secuencias pueden durar al menos dos días y que los extractos se pueden almacenar sin el peligro de una descomposición significativa por 2 semanas.

Las curvas de calibración realizadas intradía e interdía presentaron linealidad, límites de detección menores a 2.50 mg/L, siendo este el criterio de aceptación o rechazo. Además, los límites de detección en las matrices mostraron ser menores que la dosis letal media del analito más tóxico por lo que el método es eficiente para la detección de los analitos de la validación en muestras reales.

El efecto matriz mostró que este es importante, este parámetro es importante si se requiere escalar la metodología a nivel cuantitativo en donde se deben preparar la curva en matriz sino se quiere resultados erróneos con falsos porcentajes de recuperación, caso contrario de metodologías cualitativas donde su principal función es la identificación del analito.

La eficiencia de recuperación demostró los altos porcentajes de recuperación obtenidos, reafirmando que el método de extracción QuEChERS fue creado para la identificación de

plaguicidas, aun cuando fue modificado no solo por la cantidad de muestra y por el equipo sino también por el tipo de matices utilizadas. Las diferentes proporciones de resinas en el tubo d-SPE no afectaron los porcentajes de extracción, con excepción las que presentaban altas proporciones de GCB.

A pesar de que la evaluación de los porcentajes de recuperación del método oficial QuEChERS contra los porcentajes obtenidos con el método QuEChERS modificado presentaron diferencias significativas en la mayoría de los analitos, este procedimiento ha cumplido con los requerimientos establecidos.

La evaluación de la recuperación en las diferentes marcas de cerveza y jugo de manzana revelaron que es indispensable probar cada matriz antes de reportar un resultado cualitativo como negativo, ya que, aunque las matrices de una misma familia puedan ser similares, sus diferencias en componentes pueden presentar bajas porcentajes de recuperación o darse un resultado falso negativo por no cumplir con los criterios de identificación.

Asimismo, en matrices con concentraciones de etanol entre el 5 % y 12 % se demostró que generan una pérdida importante de ciertos analitos generando de igual manera la posibilidad de resultados falsos negativos. Por lo tanto, se recomienda realizar la medición del porcentaje de alcohol en las bebidas alcohólicas cuestionadas previo a la extracción. Y posterior a la extracción, concentrar el extracto para no afectar la detección.

A nivel forense esta metodología genera un inconveniente para su aplicación dado que las muestras cuestionadas son de origen desconocido. Puede ser cualquier tipo de bebida y no se pueda realizar un control positivo y negativo de matriz, sin tomar en cuenta que puede presentar altos porcentajes de alcohol en donde se puede generar falsos negativos como se mencionó anteriormente. Aun así, siempre es recomendable realizar un control positivo con una muestra conocida dopada o realizar un dopado sobre la muestra cuestionada para evaluar el comportamiento cualitativo de los analitos.

Con todos los resultados obtenidos se concluye que, la metodología validada por QuEChERS-GC/MSD para el análisis cualitativo de seis plaguicidas en cerveza y jugo de manzana cumple con los criterios requeridos para su aplicación en muestras de casos reales cuestionadas por la adulteración con este tipo de sustancias tóxicas.

Capítulo 7. Referencias bibliográficas

1. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <http://www.fao.org/in-action/agronoticias/detail/es/c/508248/> (accesado el 01 de diciembre, 2018).
2. SFE en cifras 2016, 2017. Servicio Fitosanitario del Estado. https://www.sfe.go.cr/Transparencia/Memoria_SFE_2016.pdf (accesado el 01 de diciembre, 2018).
3. Boletín Estadístico Agropecuario N° 24, 2014. Ministerio de Agricultura y Ganadería. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/BEA-0024.PDF> (accesado el 01 de diciembre, 2018).
4. Mora, S. Boletín Estadístico Agropecuario N° 27, 2017. Sistema de Información del Sector Agropecuario Costarricense. <http://www.infoagro.go.cr/BEA/BEA27.pdf> (accesado el 01 de diciembre, 2018).
5. Zeledón; Montero. Resumen Anual de las intoxicaciones en Costa Rica 2016, 2017. Red de Centros de Información y Asesoría Toxicológica de Centroamérica. https://www.redciatox.org/sites/default/files/webfiles/2018/2017_Zeledon_CR_res_anual_intox_2016.pdf (accesado el 15 de diciembre, 2018).
6. Memoria Institucional 2014 - 2018, 2018. Ministerio de Salud. https://www.ministeriodesalud.go.cr/sobre_ministerio/memorias/memoria_2014_2018/dpi_memoria%20ministerio_salud_2014_2018_1.pdf (accesado el 15 de diciembre, 2018).
7. Sistema Costarricense de información Jurídica. http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=5027&nValor3=5321&strTipM=TC (accesado el 10 de noviembre, 2018).
8. Sistema Costarricense de información Jurídica. http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=24319&nValor3=25739&strTipM=TC (accesado el 02 de diciembre, 2018).
9. Oreamuno, M. Comunicación personal, enero 2019.
10. Klaassen, C, Ed. *Casarett and Doull's toxicología: la ciencia básica de venenos*; octava edición; McGraw-Hill Education: China, 2013; pp 939-943.
11. Organismo de Investigación Judicial <https://sitiooij.poder-judicial.go.cr/index.php/oficinas/departamento-de-ciencias-forenses> (accesado el 15 de diciembre, 2018).
12. Cartín, J. Optimización y validación de una metodología para la determinación cualitativa de plaguicidas polares en un refresco carbonatado y en unas galletas por EFS-CG/DEM. Tesis Lic., Universidad de Costa Rica, San Pedro, febrero 2014.
13. Determinación de residuos de plaguicidas en alimentos de origen animal usando GC-MS y/o LC-MS-MS después de la extracción/partición de acetonitrilo y limpieza por d-SPE - método QuEChERS, 2008. Centro de desarrollo Analítico Basado en Análisis.

- http://www.chromnet.net/Taiwan/QuEChERS_Dispersive_SPE/QuEChERS_%E6%AD%90%E7%9B%9F%E6%96%B9%E6%B3%95_EN156622008_E.pdf (accesado el 10 de noviembre, 2018).
14. Recomendaciones del Grupo Científico de Trabajo para el Análisis de drogas decomisadas, versión 08, 2019. Grupo Científico de Trabajo para el Análisis de drogas decomisadas. https://swgdrug.org/Documents/SWGDRUG%20Recommendations%20Version%20208_FINAL_ForPosting_092919.pdf (accesado el 01 de diciembre, 2020).
 15. Minimum Criteria for Chromatographic-Mass Spectrometric Confirmation of the Identity of Analytes for Doping Control Purposes. WADA Technical Document – TD2021IDCR, versión 1.0. WADA Science / IDCR Working Group, abril, 2021
 16. Standard for Identification Criteria in Forensic Toxicology, 2002. Organization of Scientific Area Committees OSAC. https://www.nist.gov/system/files/documents/2019/04/22/chsac_-_identification_in_forensic_toxicology_-_for_asb_and_website_1.pdf (accesado el 18 de septiembre, 2021).
 17. Código internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas, 2013. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <http://www.fao.org/3/a-i3604s.pdf> (accesado el 02 de diciembre, 2018).
 18. Rojas, E. Prohibición y restricción en el uso y comercialización de plaguicidas agrícolas en Costa Rica, 2016. Ministerio de Agricultura y Ganadería. http://www.mag.go.cr/rev_agr/v40n01_089.pdf (accesado el 02 de diciembre, 2018).
 19. Clasificación recomendada por WHO de plaguicidas por peligrosidad y guías de clasificación 2009, 2010. Organización Mundial de la Salud. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44271/9789241547963_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y (accesado el 07 de diciembre, 2018).
 20. Balali, M; Abdollahi, M; Springer, Eds. Química y clasificación de compuestos organofosforados. En *Toxicología Básica y Clínica de Compuestos Organofosforados* [Online]; Springer-Verlag: London, 2014; pp 2,3,9-12. <https://link-springer-com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/content/pdf/10.1007%2F978-1-4471-5625-3.pdf> (accesado el 07 de diciembre, 2018).
 21. Editor molecular JSME. <http://biomodel.uah.es/en/DIY/JSME/draw.es.htm> (accesado el 26 de enero, 2018).
 22. Productos restringidos en Costa Rica, 2018. Servicio Fitosanitario del Estado. https://www.sfe.go.cr/DocsStatusRegistro/Listado_de_Restringidos.pdf (accesado el 08 de diciembre, 2018).
 23. Plaguicidas Registrados amparados a la Ley 8702. Servicio Fitosanitario del Estado. https://www.sfe.go.cr/DocsStatusRegistro/Plaguicidas_aprobados_Ley_8702.pdf (accesado el 08 de diciembre, 2018).

24. Tomlin, C, Ed. *Manual de plaguicidas*; decimoquinto edición; British Crop Production Council: Reino Unido, 2009; pp 203, 321, 446, 697, 866, 892.
25. Ramírez, F. Importación de plaguicidas en Costa Rica: periodo 2007-2009, 2011. Programa Ambiental del Caribe. http://cep.unep.org/repcar/informacion-de-paises/costa-rica/Impoortaciones_07-09_REPCar.pdf (accesado el 08 de diciembre, 2018).
26. Correa, A. Manual para el Registro de Plaguicidas en Centroamérica, 2011. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <http://www.fao.org/docrep/019/as399s/as399s.pdf> (accesado el 14 de diciembre, 2018).
27. Delgado, H. Análisis de la exposición de compuestos emergentes en varios escenarios de usos del agua. Tesis MSc. [Online], Universidad Politécnica de Cataluña, Barcelona, febrero 2016. <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/84968/TFM.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (accesado el 22 de diciembre, 2018).
28. Lotti, M. *Handbook of pesticide of toxicology*; 2ª edición; Academic Press: Estados Unidos, 2001; pp 1055,1056.
29. Sang, Z; Wang, Y; Tsoi, Y; Leung, K. CODEX-compliant eleven organophosphorus pesticides screening in multiple commodities using headspace-solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry* [Online] **2013**, 136, 710-711.
30. Harshit, D; Charmy, K; Nrupesh, P. Organophosphorus pesticides by novel HPLC and spectrophotometric method. *Food Chemistry* [Online] **2017**, 230, 448-449.
31. Bidari, A; Reza, M; Norouzi, P; Milani, R; Assadi, Y. Sample preparation method for the analysis of some organophosphorus pesticide residues in tomato by ultrasound-assisted solvent extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction. *Food Chemistry* [Online] **2011**, 126, 1814.
32. Seebunrueng, K; Santaladchaniyakit, Y; Soisungnoen, P; Srijaranai, S. Catanionic surfactant ambient cloud point extraction and high-performance liquid chromatography for simultaneous analysis of organophosphorus pesticide residues in water and fruit juice samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [Online] **2011**, 401, 1703-1706.
33. Xie, J; Liu, T; Song, G; Hu, Y; Deng, Ch. Simultaneous analysis of organophosphorus pesticides in water by magnetic solid-phase extraction coupled with GC-MS. *Chromatographia* [Online] **2013**, 76, 535.
34. Sajid, M; Basheer, Ch; Mansha, M. Membrane protected micro-solid-phase extraction of organochlorine pesticides in milk samples using zinc oxide incorporated carbon foam as sorbent. *Journal of Chromatography A* [Online] **2016**, 1475, 110-112.
35. Rejczak, T; Tuzimski, T. QuEChERS-based extraction with dispersive solid phase extraction clean-up using PSA and ZrO₂-based sorbents for determination of

- pesticides in bovine milk samples by HPLC-DAD. *Food Chemistry* [Online] **2017**, 217, 225.
36. Deng, M; Yu, T; Luo, H; Zhu, T; Huang, X; Luo, L. Direct detection of multiple pesticides in honey by neutral desorption-extractive electrospray ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* [Online] **2017**, 422, 111-112.
37. He, J; Song, L; Chen, S; Li, Y; Wei, H; Zhao, D; Gu, K; Zhang, S. Novel restricted Access materials combined to molecularly imprinted polymers for selective solid-phase extraction of organophosphorus pesticides from honey. *Food Chemistry* [Online] **2015**, 187, 331.
38. Souza, P; da Silva, F; Correa, E; Silva, G; de Abreu, M; Fernandes, Ch. Multiclass method for pesticides quantification in honey by means of modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry* [Online] **2016**, 211, 130-133.
39. Giulivo, M; Capri, E; Eljarrat, E; Barceló, D. Analysis of organophosphorus flame retardants in environmental and biotic matrices using on-line turbulent flow chromatography-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [Online] **2016**, 1474, 71-73.
40. Navarro, A. Desarrollo y validación de la metodología analítica cualitativa para la determinación de fenoxiácidos en madera por EFSD-CG/DEM. Tesis Lic., Universidad de Costa Rica, San Pedro, 2016.
41. Wilkowska, A; Biziuk, M. Determination of pesticides residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry* [Online] **2011**, 125, 804-810.
42. Marques, G; Siqueira, A; Minassa, V; Peres, M; Pelicão, F; Sampaio, K. Method validation for simultaneous determination of atropine, pralidoxime and 12 organophosphorus compounds in blood samples by means of high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of Chromatography B* [Online] **2018**, 1097-1098, 44-46.
43. Ferrari, E; Dutra, E. Simultaneous determination of drugs and pesticides in postmortem blood using dispersive solid-phase extraction and large volumen injection-programmed temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Science International* [Online] **2018**, 290, 318.
44. Valente, N; Tarelho, S; Castro, A; Silvestre, A; Teixeira, H. Analysis of organophosphorus pesticides in whole blood by GC-MS- μ ECD with forensic purposes. *Journal of Forensic and Legal Medicine* [Online] **2015**, 33, 28-29.
45. Anastassiades, M; Lehotay, S. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* [Online] **2003**, 86, 412-413.
46. AOAC oficial method 2007.01 pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate. *Journal of AOAC International* [Online] **2007**, 90, 485.
47. Plössl, F; Giera, M; Bracher, F. Multiresidue analytical method using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry to

- determine pharmaceuticals in whole blood. *Journal of Chromatography A* [Online] **2006**, 1135, 19.
48. Usui, K; Hayashiki, Y; Hashiyada, M; Funayama, M. Rapid drug extraction from human whole blood using a modified QuEChERS extraction method. *Legal Medicine* [Online] **2012**, 14, 286-296.
 49. Gómez, P; Jiménez, P; Delgado, D; Martínez, E; Mojica, M; Godino, A; García, A. Development of a QuEChERS method for simultaneous analysis of antibiotics in carcasses for supplementary feeding of endangered vultures. *Science of the Total Environment* [Online] **2018**, 626, 319-320.
 50. Saint, M; Inthavong, Ch; Bertin, T, Lavison, G; Guérin, T; Fournier, A; Feidt, C; Rychen, G; Parinet, J. Development and validation of an HPLC-MS/MS method with QuEChERS extraction using isotopic dilution to simultaneously analyze chlordecone and chlordecol in animal livers. *Food chemistry* [Online] **2018**, 252, 147.
 51. Correia, L; Norberto, S; Delerue, C; Calhau, C; Domingues, V. Micro-QuEChERS extraction coupled to GC-MS for a fast determination of bisphenol A in human urine. *Journal of Chromatography B* [Online] **2018**, 1072, 9.
 52. Oreamuno, M; Guerrero, B. *Validación de la metodología cualitativa para la determinación de ω -cloroacetofenona, o-clorobencilidenomalononitrilo, capsaicina y dihidrocapsaicina por QuEChERS - GC/MSD en prendas de vestir*; Departamento de Ciencias Forenses: Heredia, 2018, 1.
 53. Marsin, M; Farhana, N; Miskam, M; Aini, W; Aboul, H. Analysis of organophosphorus pesticides in vegetable samples by hollow fiber liquid phase microextraction coupled with gas chromatography-electron capture detection. *Journal of liquid chromatography and related technologies* [Online] **2010**, 33, 293-295.
 54. Vincenzo, M; Avino, P; Cinelli, G; Notardonato, I. Sampling of organophosphorus pesticides at trace levels in the atmosphere using XAD-2 adsorbent and analysis by gas chromatography coupled with nitrogen-phosphorus and ion-trap mass spectrometry detectors. *Analytical and bioanalytical chemistry* [Online] **2012**, 404, 1517,1518.
 55. Berijan, S; Sadigh, M; Pournamdari, E. Homogeneous liquid-liquid microextraction for determination of organophosphorus pesticides in environmental water samples prior to gas chromatography-flame photometric detection. *Journal of chromatographic science* [Online] **2016**, 54, 1061, 1062.
 56. Valente, N; Tarelho, S; Castro, A; Silvestre, A; Teixeira, H. Analysis of organophosphorus pesticides in whole blood by GC-MS- μ ECD with forensic purposes. *Journal of forensic and legal medicine* [Online] **2015**, 33, 28,29.
 57. Wu, Ch; Liu, H; Liu, W; Wu, Q, Wang, Ch; Wang, Z. Determination of organophosphorus pesticides in environmental water samples by dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of floating organic droplet followed by high-performance liquid chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry* [Online] **2010**, 397, 2543, 2544.

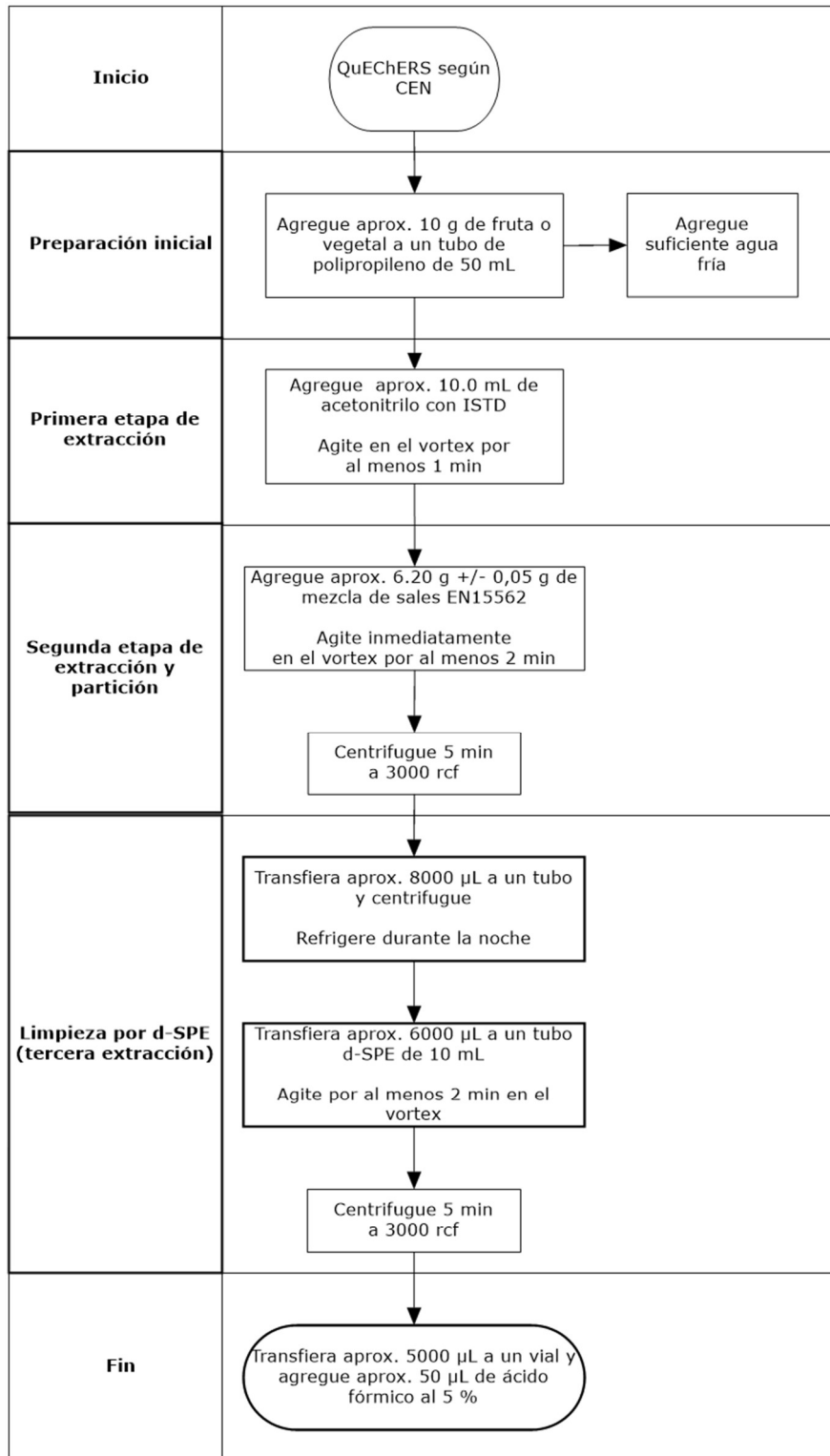
58. Departamento de ingeniería química, Universidad de Yale. Chromatography: the separation technique of the 20th century. *Chromatographia* [Online] **2000**, 51, 7, 11, 12.
59. Skoog, D; West, D; Holler, F; Crouch, S. *Fundamentos de química analítica*; novena edición, Cengage learning, 2015; pp 84, 85, 188, 803-807, 809, 811, 869, 878, 888-895, 905.
60. Zuo, H; Qing, F; Hua, W; Ning, Z. Preparative gas chromatography and its applications. *Journal of chromatographic science* [Online] **2013**, 51, 704, 707, 708.
61. The origins of GC carrier gases: putting a genie in the bottle. *LCGC North America*, enero, 2014, pp 31, 33. <https://www.chromatographyonline.com/view/origins-gc-carrier-gases-putting-genie-bottle> (accesado 08 de junio, 2021)
62. Troubleshooting GC gas supply sample preparation, and inlets. *LC-GC North America* [Online] **2013**, 31, p 1.
63. Zrostlíková, J; Hajslová, J; Godula, M; Mastovská, K. Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticides residues in plant matrices. *Journal of Chromatography* [Online] **2001**, 937, 73, 74.
64. Peng, M; Le, J; Yang, Y. Simultaneous determination of 11 related impurities in propofol by gas chromatography/tandem mass spectrometry coupled with pulsed splitless injection technique. *Journal of Separation Science* [Online] **2013**, 36, 1959, 1960.
65. Troubleshooting real GC problems. *LC-GC North America* [Online] **2014**, 32, p 1.
66. Analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed, 2019. EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides. https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf (accesado el 22 de agosto, 2021).
67. Bell, S. *Química Forense*; tercera edición; CRC Press Taylor & Francis Group: United States of America, 2022; pp 1, 2.
68. Recommended guidelines for forensic identification of intact explosives. TWGFEX Laboratory Explosion Group Standards and Protocols Committee. https://www.nist.gov/system/files/documents/2018/09/21/twgfex_guide_for_the_forensic_identification_of_intact_explosives.pdf (accesado el 22 de agosto, 2021).
69. Aderjan, R; Daldrup, T; Käferstein, H; Krause, D; Mußhoff, F; Paul, L; Peters, F; Rochholz, G; Schmitt, G; Skopp G. Guidelines for the determination of blood alcohol concentrations (BAC) for forensic purposes, 2011. Society of Toxicological and Forensic Chemistry. <https://www.gtfc.org/cms/images/stories/files/BAC-Guidelines-DGRM-GTFCh-DGVM-Blutalkohol-2011.pdf> (accesado el 22 de agosto, 2021).
70. Moffat, A; Osselton, D; Widdop, B; Watts, J, Eds. *Análisis Clarks para drogas y venenos*; Pharmaceutical Press: USA, 2011; pp 532, 534, 536, 592.
71. Curry, A. A simple infrared spectrum retrieval system. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [Online] **1969**, 21, 224-231.

72. Mathieson, D. *Pharmaceutical Journal* [Online] **1976**, 21673.
73. Stashenko, E; Martínez, J. Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica* [Online] **2010**, 2, p 37.
74. Métodos recomendados para la identificación y el análisis de cocaína en materiales incautados, 2012. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. https://www.unodc.org/documents/scientific/Cocaine_S.pdf (accesado el 15 de diciembre, 2018).
75. Sagrado, S; Bonet, E; Medina, M; Martín, Y. *Manual práctico de calidad en los laboratorios enfoque ISO 17025*; segunda edición; Asociación Española de Normalización y Certificación: Madrid, 2005; pp 96.
76. Directrices para la validación de métodos analíticos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos, 2010. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf (accesado el 16 de diciembre, 2018).
77. Thompson, M. La sorprendente función de Horwitz. *Royal Society of Chemistry* [Online] **2004**, 17, pp. 1, 2.
78. Westgard, J. Métodos básicos para validación; Westgard QC: Madison, 2013; pp 65,66,128-130, 132.
79. Formato estándar y orientación para los documentos de los requisitos de rendimiento de métodos estándar AOAC (SMPR), 2011. Asociación de Químicos Oficiales Agrícolas. http://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/ISPAM/3.5SMPRGuidelinev12.1.pdf (accesado el 22 de diciembre, 2018).
80. Agilent GC-MSD ChemStation and instrument operation, 2005. Agilent Technologies, pp 97, 98. http://www.pacificcrn.com/Upload/file/201703/05/20170305062908_99648.pdf (accesado el 02 de julio, 2021).
81. Riley, Ch; Rosanske, T. Desarrollo y validación de métodos analíticos; Elsevier Science Ltd, 1996; p 182.
82. Sistema GC/MSD Agilent serie 5975C TAD. Agilent Technologies. <https://www.agilent.com/cs/library/datasheets/Public/5989-6351ES.pdf> (accesado el 26 de septiembre, 2020).
83. Agilent Technologies. *Agilent GC-MSD ChemStation and Instrument Operation "Basique"*, D.00.00; Agilent Technologies: United States of America, 2000; pp 96,107-109, 113.
84. Spiridonov, V; Lopatkin, A. Tratamiento matemático de datos físico-químicos, primera edición; MIR: Moscú, 1973; pp 97-114.
85. Miller, J; Miller J. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, sexta edición; Pearson Educación: London, 2010; pp 38, 39, 43-55, 125-126, 135-139, 208, 283.

86. Maštovská, K; Lehotay, S. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. *Journal of chromatographic A* [Online] **2004**, 1040, 259-262.
87. Busch, M; Stein, G; Poppitz, W; Hein, G; Müller, A. Validated capillary gas chromatographic-mass spectrometric assay to determine 2-methylcitric acid I and II levels in human serum by using a pulsed splitless injection procedure. *Journal of Chromatography B* [Online] **2002**, 775, 218.
88. Safety Data Sheet. Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CR&language=en&productNumber=34851&brand=SIGALD&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsigald%2F34851%3Flang%3Den> (accesado el 17 de octubre, 2020).
89. Cherta, L; Beltran, J; Portolés, T. *Multiclass determination of 66 organic micropollutants in environmental water samples by fast gas chromatography-mass spectrometry*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [Online] **2012**, 402, 2301-2314.
90. Standard for mass spectral data acceptance in forensic toxicology. Organization of Scientific Area Committees for forensic science. https://www.nist.gov/system/files/documents/2019/03/20/standard_for_mass_spectral_data_acceptance_-_asb.pdf (accesado el 26 de septiembre, 2020).
91. Racke, K; Fontaine, D; Yoder, R; Miller, J. *Chlorpyrifos degradation in soil at termiticidal application rates*. *Journal of Pesticide Science* [Online] **1994**, 42, 44-49.
92. Lozowicka, B; Rutkowska, E; Jankowska, M. *Influence of QuEChERS modifications on recovery and matrix effect during the multi-residue pesticide analysis in soil by GC/MS/MS and GC/ECD/NPD*. *Environmental Science and Pollution Research* [Online] **2017**, 24, 7124-7138.
93. Anastassiades, M; Mastovska, K; Lehotay, S. *Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides*. *Journal of chromatography A* [Online] **2003**, 1015, 163-184.
94. Cruz, V; Freitas, M; Pacheco, J; Oliveira, J; Fernandes, V; Delerue, C. *Magnetic dispersive micro solid-phase extraction and gas chromatography determination of organophosphorus pesticides in strawberries*. *Journal of Chromatography A* [Online] **2018**, 1566, 9-12.
95. Nasiri, M; Ahmadzadeh, H; Amiri, A. *Organophosphorus pesticides extraction with polyvinyl alcohol coated magnetic graphene oxide particles and analysis by gas chromatography-mass spectrometry: Application to apple juice and environmental water*. *Talanta* [Online] **2021**, 227, 2-4.

Capítulo 8. Anexos

8.1. Anexo 1: Diagrama de la metodología de extracción oficial por QuEChERS de la Norma Europea EN15662:2008



8.2. Anexo 2: Calibración dinámica de los iones principales

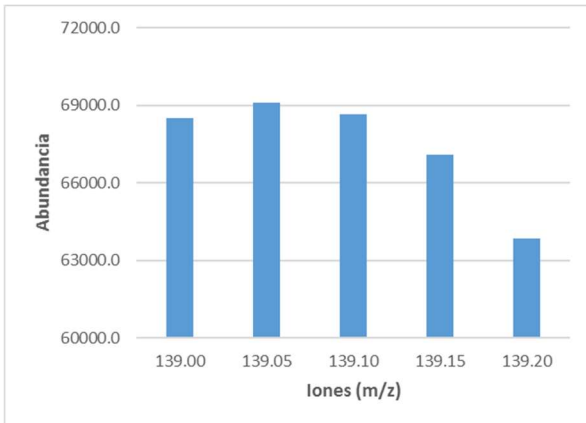


Figura 44. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 139.10 m/z de etoprofos.

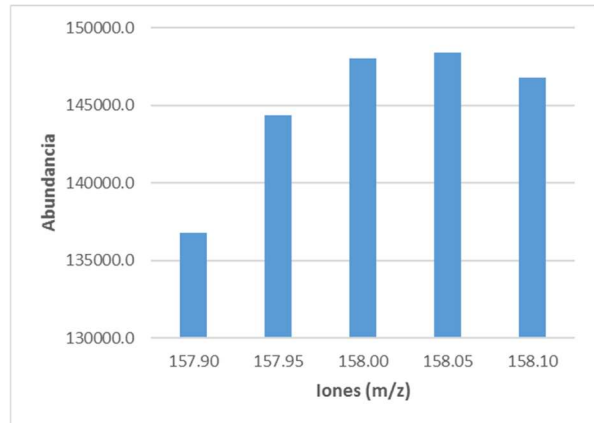


Figura 45. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 158.00 m/z de etoprofos.

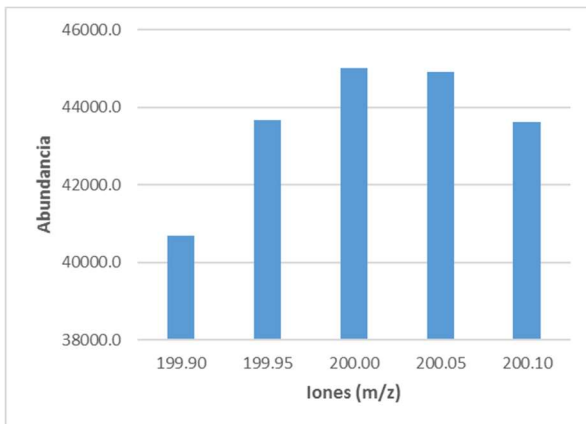


Figura 46. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 200.00 m/z de etoprofos.

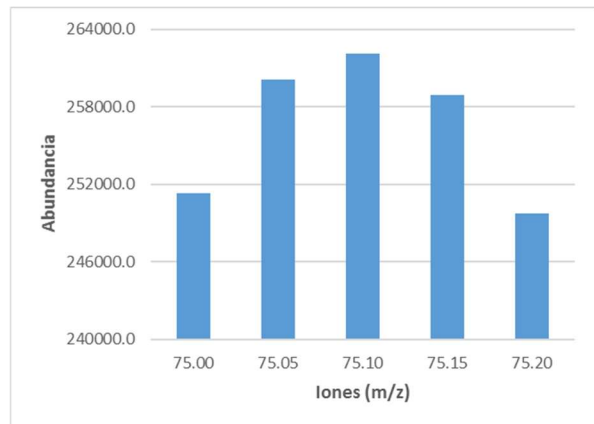


Figura 47. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 75.10 m/z de forato.

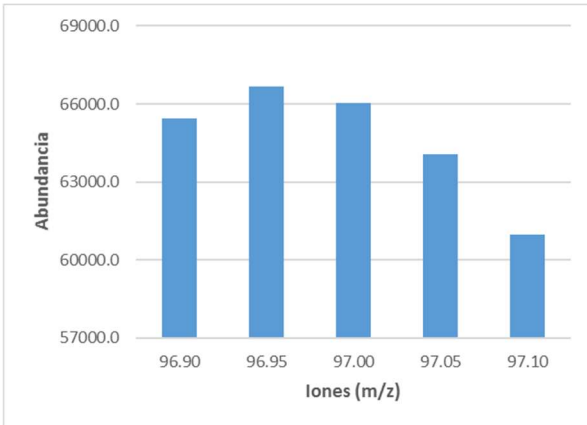


Figura 48. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 97.00 m/z de forato.

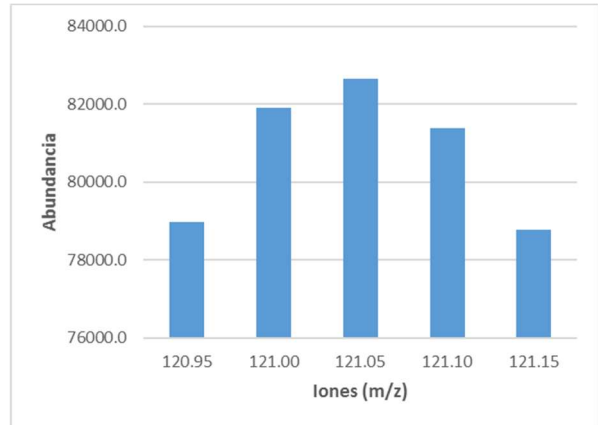


Figura 49. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 121.05 m/z de forato.

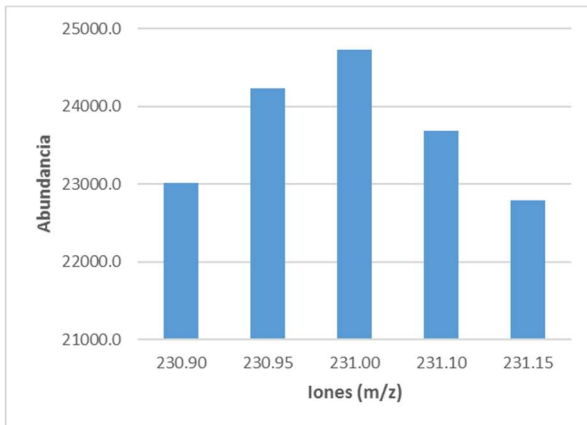


Figura 50. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 231.00 m/z de forato.

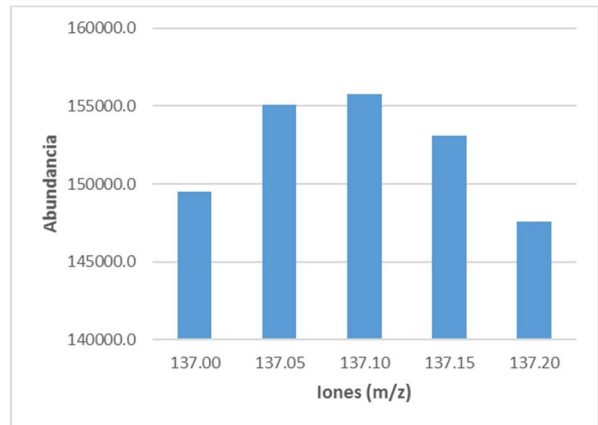


Figura 51. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 137.10 m/z de diazinón.

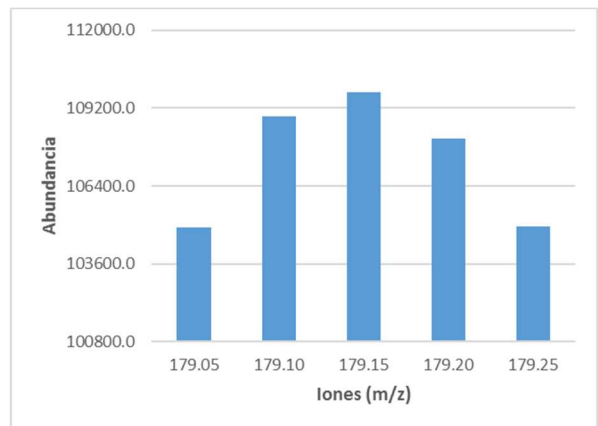
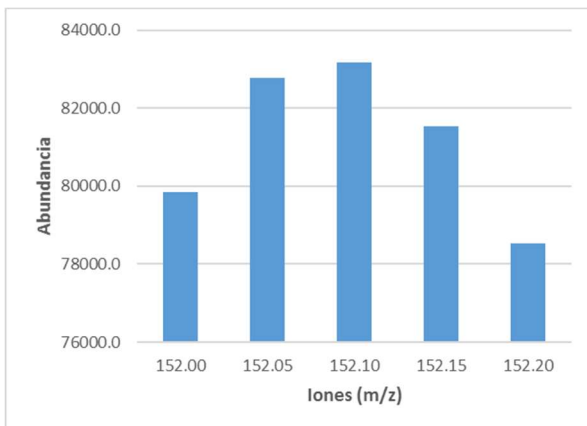


Figura 52. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 152.10 m/z de diazinón.

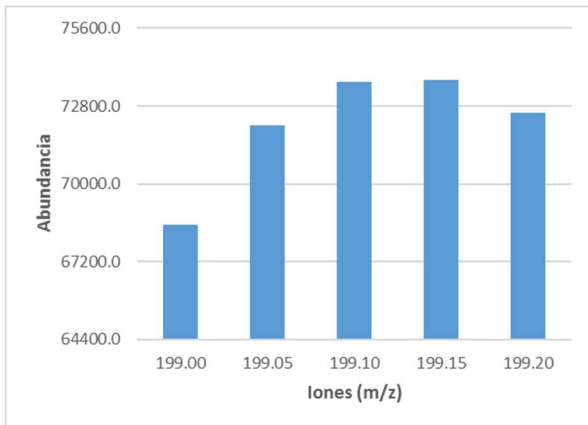


Figura 53. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 179.15 m/z de diazinón.

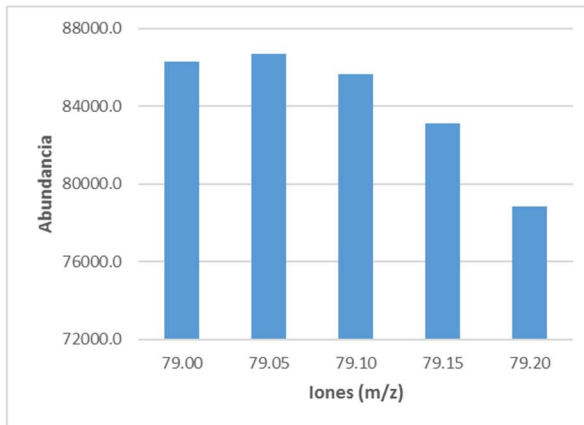


Figura 54. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 199.10 m/z de diazinón.

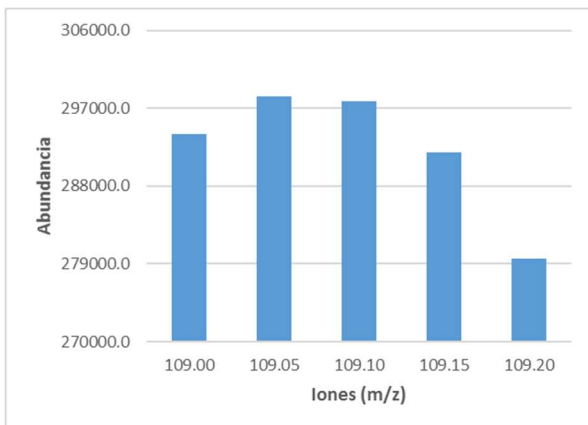


Figura 55. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 79.10 m/z de metilparatión.

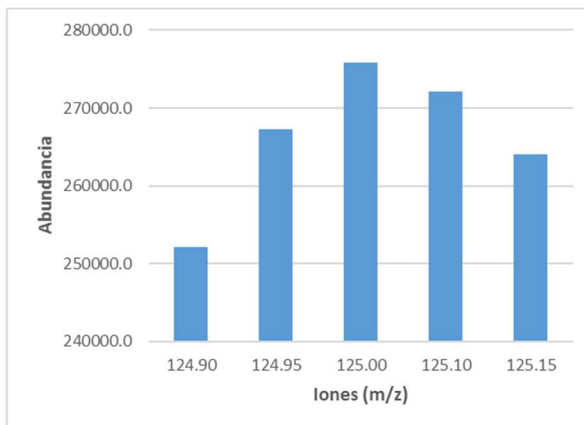


Figura 56. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 109.10 m/z de metilparatión.

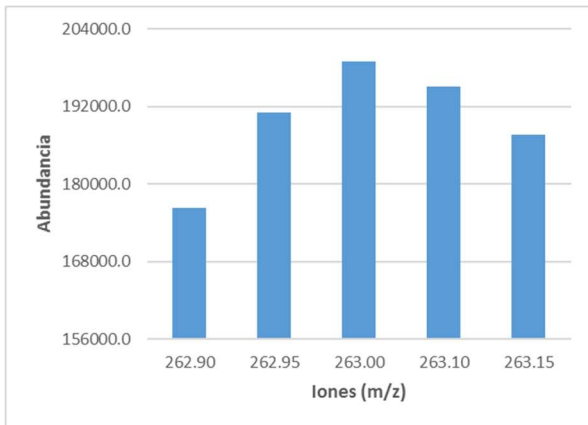


Figura 57. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 125.00 m/z de metilparatión.

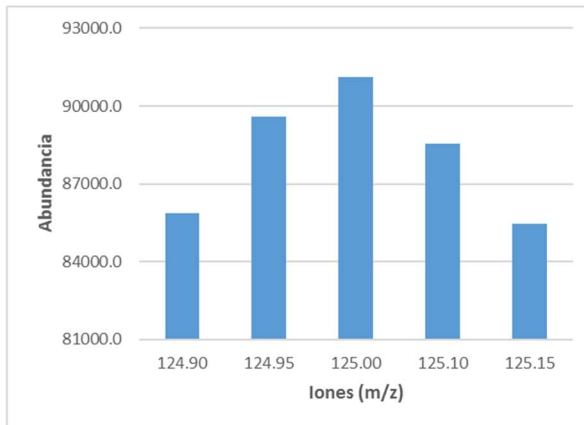


Figura 58. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 263.00 m/z de metilparatión.

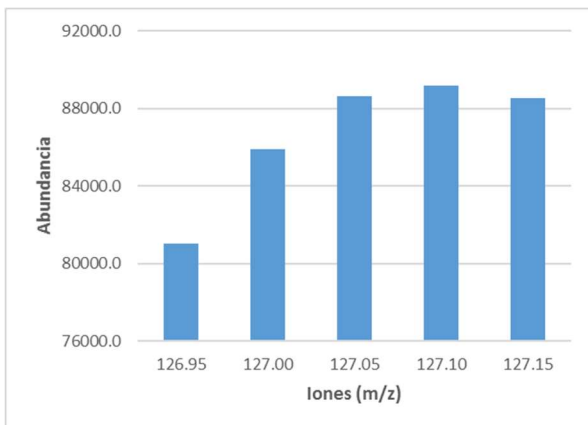


Figura 59. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 125.00 m/z de malatión.

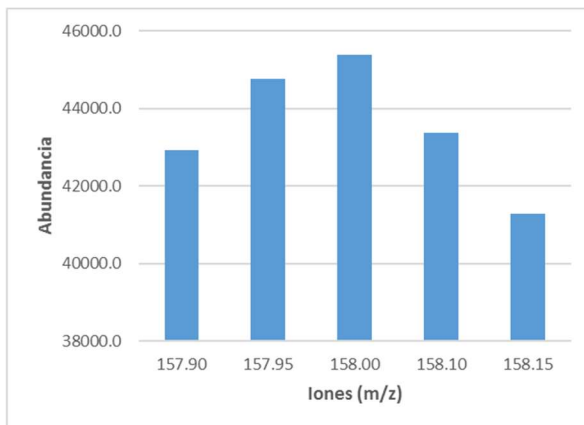


Figura 60. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 127.05 m/z de malatión.

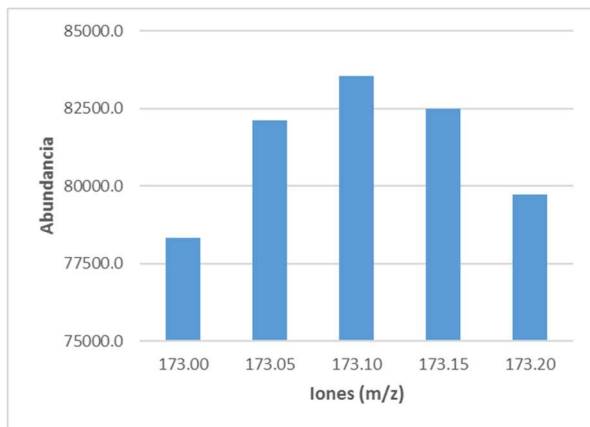


Figura 61. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 158.00 m/z de malatión.

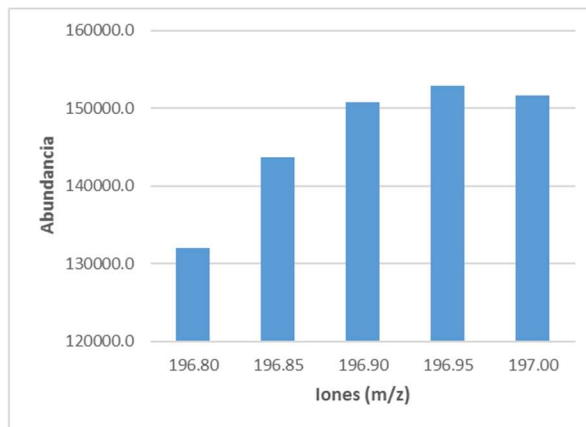


Figura 62. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 173.10 m/z de malatión.

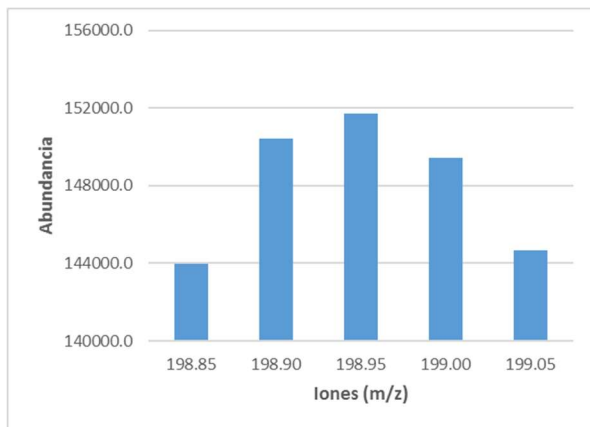


Figura 63. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 196.90 m/z de clopirifós.

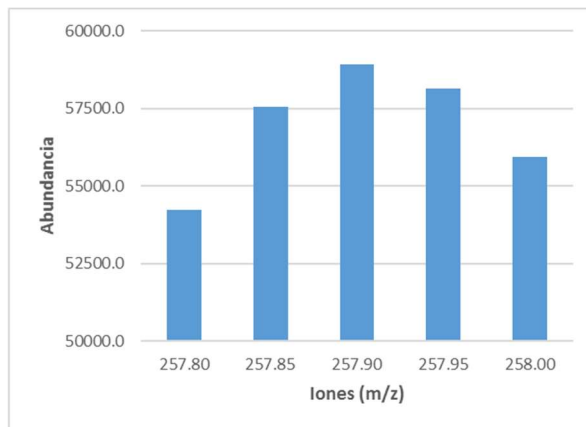


Figura 64. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 198.95 m/z de clopirifós.

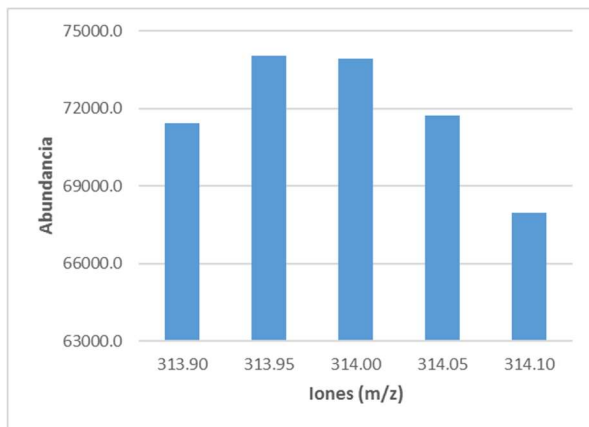


Figura 65. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 257.90 m/z de clopirifós.

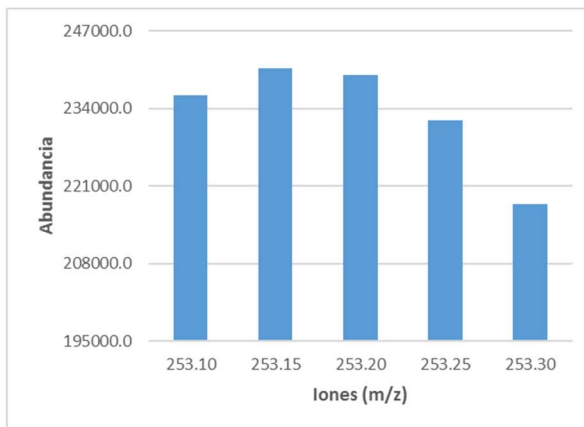


Figura 66. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 314.00 m/z de clopirifós.

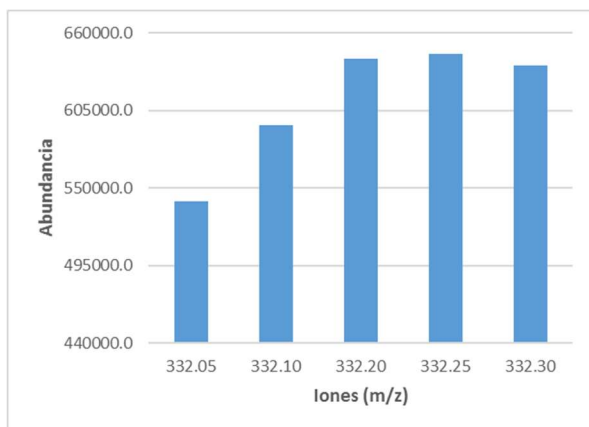
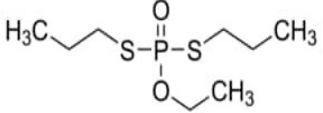
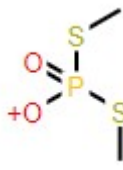
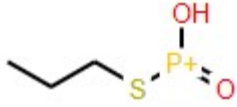
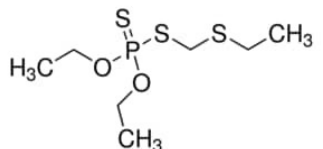
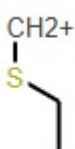
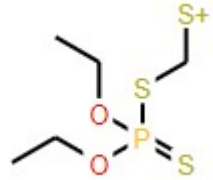
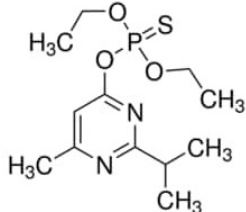
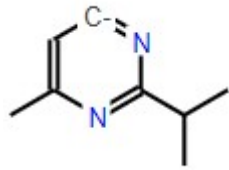
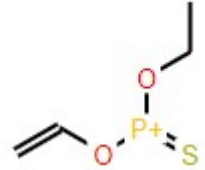
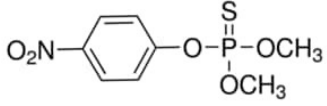
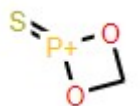
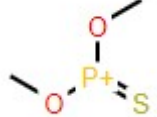
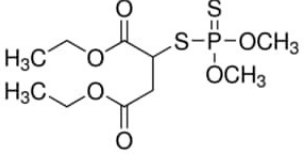
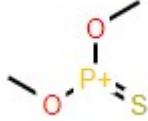
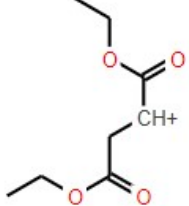
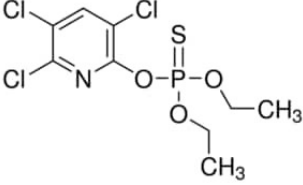
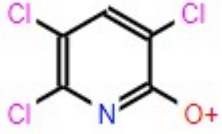
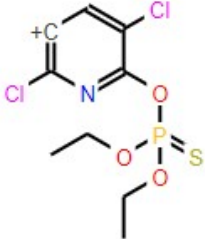


Figura 67. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 253.20 m/z de tetrafeniletileno.

Figura 68. Abundancias obtenidas de la calibración dinámica del ion 332.20 m/z de tetrafeniletileno.

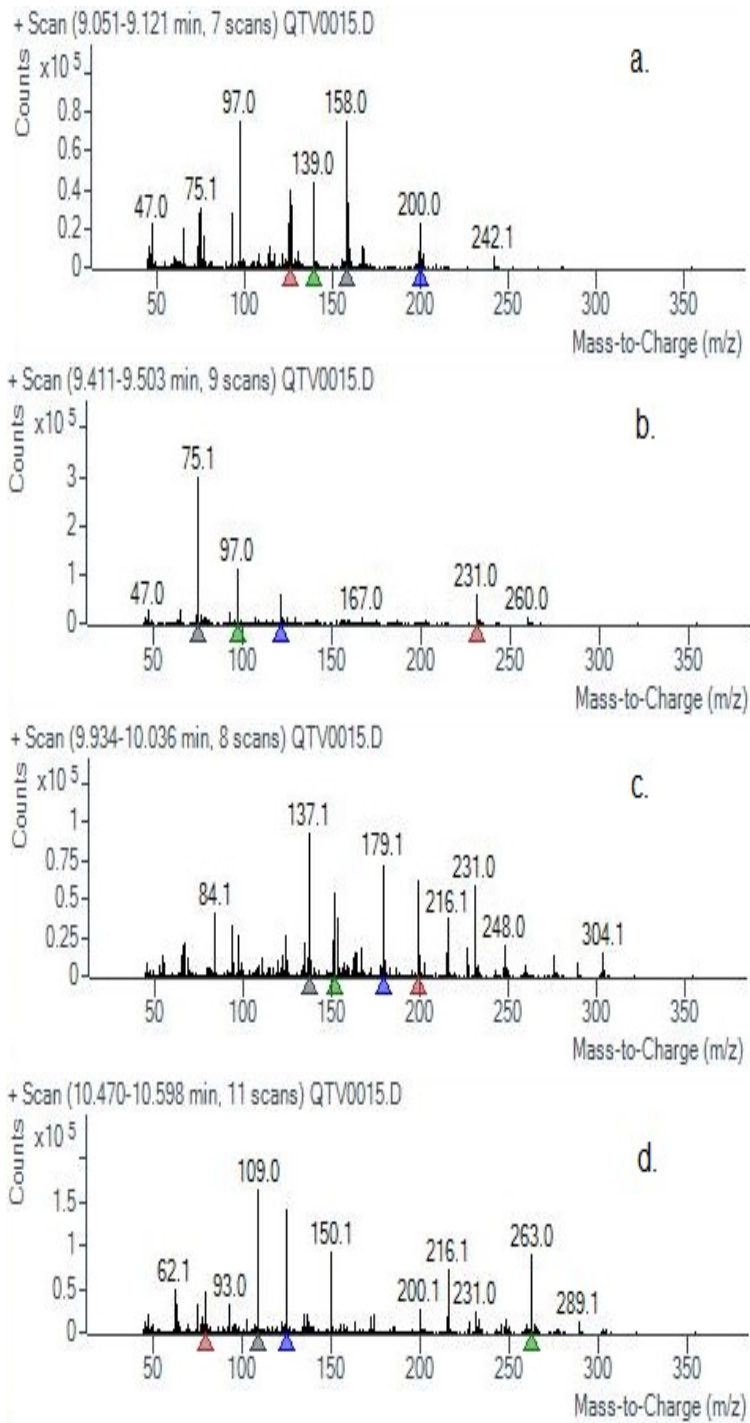
8.3. Anexo 3: Estructuras de los fragmentos positivos más abundantes del ión base y un ión calificador para cada analito

Analitos	Estructura química	Iones seleccionados	Estructura lineal de los carbocationes
etoprofós		158.05	
		139.05	
forato		75.10	
		231.00	
diazinón		137.10	
		152.10	
metilparatión		109.05	
		125.00	

Analitos	Estructura química	Iones seleccionados	Estructura lineal de los carbocationes
malatión		125.00	
		173.10	
clorpirifós		196.95	
		314.00	

8.4. Anexo 4: Espectros de masas de los analitos y del estándar interno

Los iones seleccionados se muestran con un triángulo de color en la parte inferior.



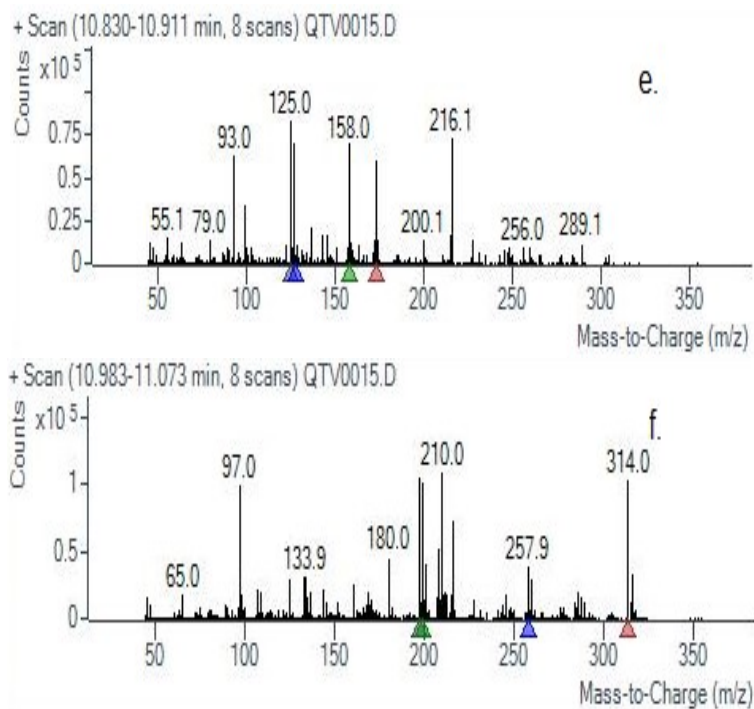


Figura 69. Espectros de masas en modo SCAN de: a. etoprofós, b. forato, c. diazinón, d. metilparatión, e. malatión, f. clorpirifós.

8.5. Anexo 5: Curvas de calibración utilizadas para el cálculo de los porcentajes de recuperación preparados con los extractos de cerveza o de jugo de manzana

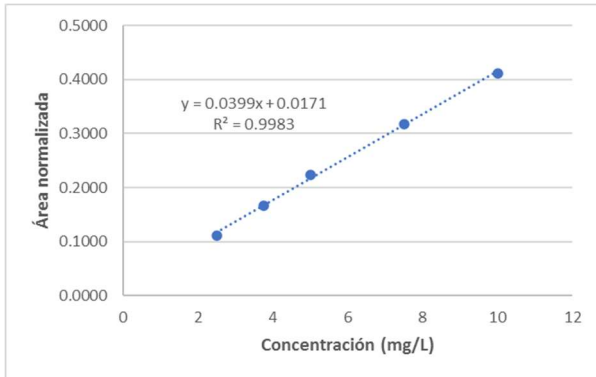


Figura 70. Curva de calibración de etoprofos en extracto de cerveza.

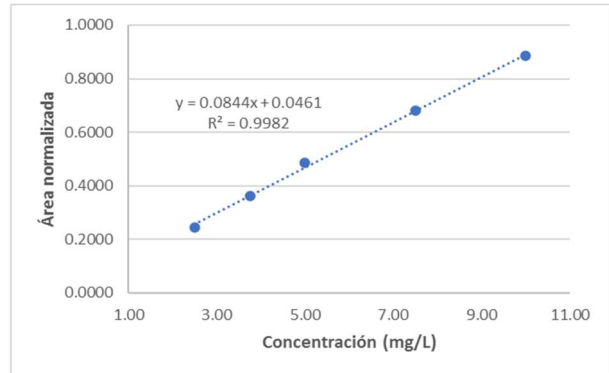


Figura 71. Curva de calibración de forato en extracto de cerveza.

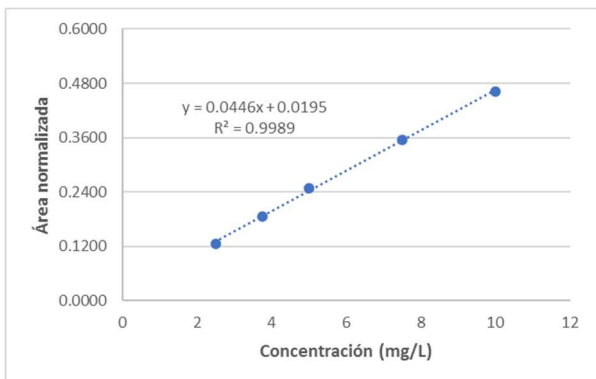


Figura 72. Curva de calibración de diazinón en extracto de cerveza.

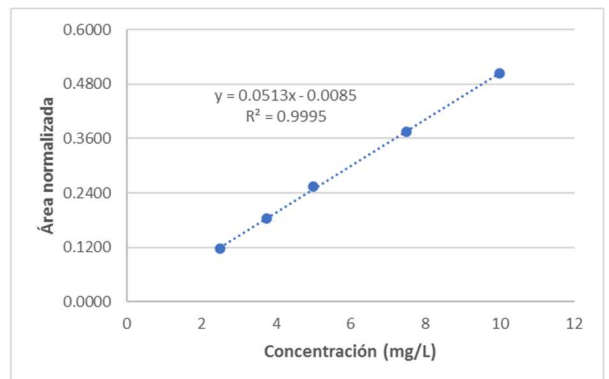


Figura 73. Curva de calibración de metilparatión en extracto de cerveza.

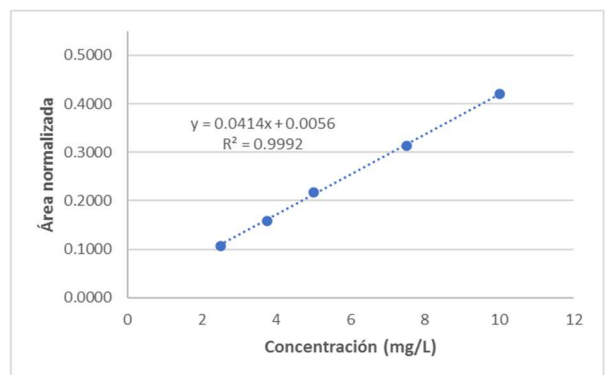
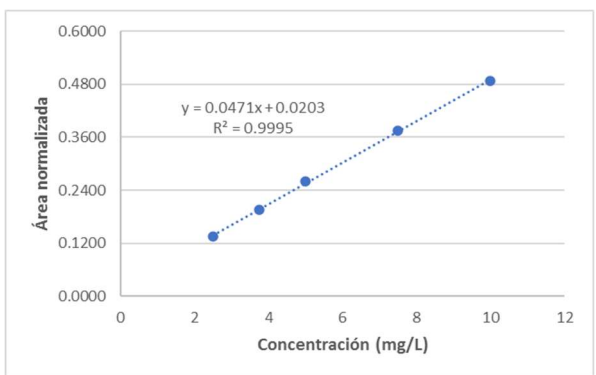


Figura 74. Curva de calibración de malatión en extracto de cerveza.

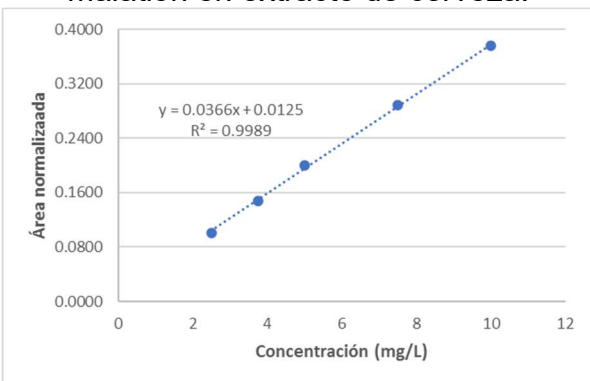


Figura 75. Curva de calibración de clorpirifós en extracto de cerveza.

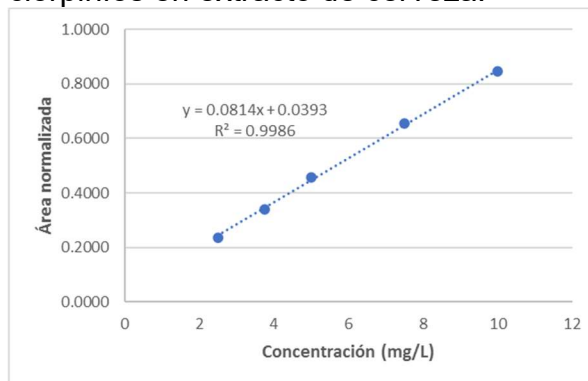


Figura 76. Curva de calibración de etoprofos en extracto de jugo de manzana.

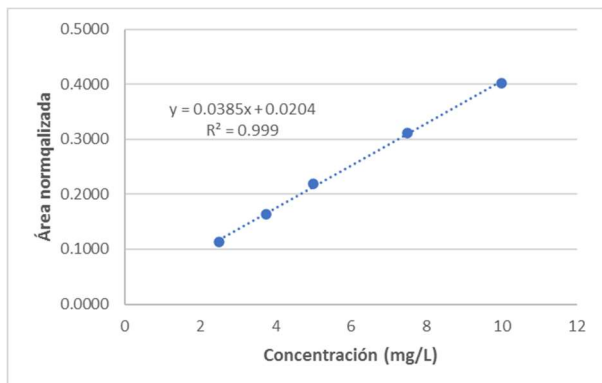


Figura 77. Curva de calibración de forato en extracto de jugo de manzana.

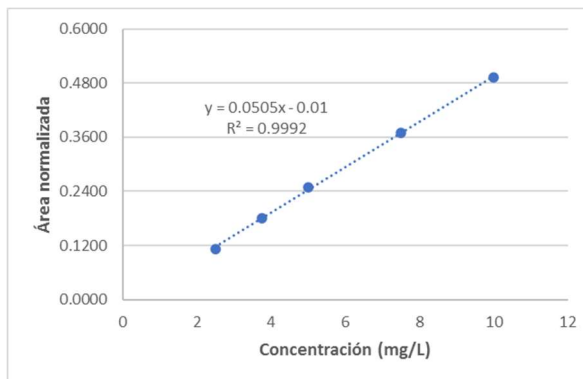


Figura 78. Curva de calibración de diazinón en extracto de jugo de manzana.

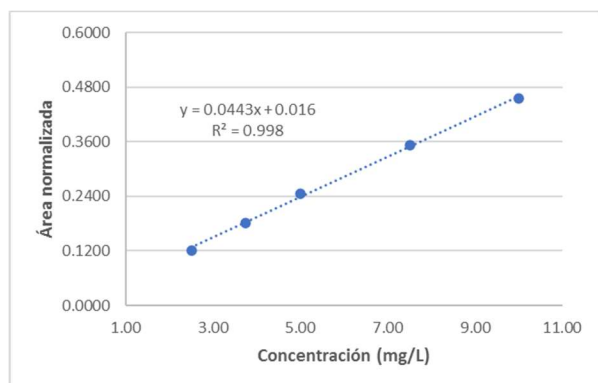


Figura 79. Curva de calibración de metilparatión en extracto de jugo de manzana.

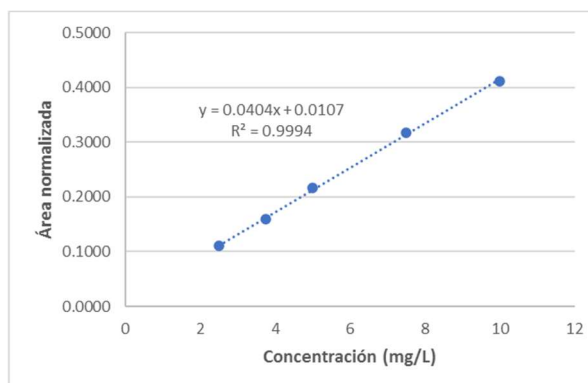


Figura 80. Curva de calibración de malatión en extracto de jugo de manzana.

Figura 81. Curva de calibración de clorpirifós en extracto de jugo de manzana.