



Servicio Nacional
de **Medicina Legal**
y **Ciencias Forenses**

INSTRUCTIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES – MASAS COMO MÉTODO CONFIRMATORIO.

Octubre, 2017



Código: SNMLCF-ML-TOXICOLOGIA-07	INSTRUCTIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS POR CROMATOGRAFIA DE GASES-MASAS COMO MÉTODO CONFIRMATORIO.	Versión: 1.0 Página 2 de 15
----------------------------------	--	--------------------------------

CONTROLES

ELABORACIÓN DEL INSTRUCTIVO.

Fase	Nombre / cargo	Firma	Fecha
Elaborado o Modificado por:	Bqc. Catalina Carrillo		24/05/2017
	Mgs Luz Cadavid		
	Ftco. Milagros Marcano		
	Bq. Silvia Yumiseba		
PERITOS DE LA GESTIÓN TOXICOLOGÍA FORENSE			

APROBACIÓN METODOLÓGICA DE LA GESTIÓN ESTRATÉGICA

FASE	Nombre / Cargo	Firma	Fecha
Asistencia técnica:	Ing. Alejandra Pérez M. ANALISTA DE LA UNIDAD DE PROCESOS, SERVICIOS Y CALIDAD		29/09/2017
Revisado por:	Lcdo. Christian Escobar RESPONSABLE DE LA UNIDAD DE PROCESOS, SERVICIOS Y CALIDAD		29/09/2017
Aprobado por:	Mgs. Sheldon López COORDINADOR GENERAL DE PLANIFICACIÓN Y GESTIÓN ESTRATÉGICA		29/09/2017

APROBACIÓN TÉCNICA

Nombre / Cargo	Firma	Fecha
Lcda. María Elisa Lara. COORDINADORA TÉCNICA DE SERVICIOS DE MEDICINA LEGAL		30/10/2017

CONTROL E HISTORIAL DE CAMBIOS

Versión	Descripción del cambio	Fecha de creación/actualización
1.0	Primer versión del Instructivo para la Determinación de Plaguicidas por Cromatografía de Gases-Masas como método confirmatorio.	24/05/2017



ÍNDICE DE CONTENIDO

INFORMACIÓN BÁSICA.....	4
GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS.....	5
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	5
ABREVIATURAS.....	6
DESCRIPCIÓN DEL INSTRUCTIVO.....	6
FUNDAMENTO TEÓRICO.....	6
NORMAS DE SEGURIDAD.....	8
BIBLIOGRAFÍA.....	9
ANEXOS.....	9

ÍNDICE DE TABLAS.

TABLA 1.....	13
TABLA 2.....	14

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.

ILUSTRACIÓN 1.....	9
ILUSTRACIÓN 2.....	9
ILUSTRACIÓN 3.....	10
ILUSTRACIÓN 4.....	11
ILUSTRACIÓN 5.....	11
ILUSTRACIÓN 6.....	12
ILUSTRACIÓN 7.....	12
ILUSTRACIÓN 8.....	13
ILUSTRACIÓN 9.....	14



1. INFORMACIÓN BÁSICA.

Macroproceso:	PERICIAS TÉCNICO CIENTÍFICAS
Proceso:	PERICIAS TÉCNICO CIENTÍFICAS MEDICINA LEGAL
Subproceso:	GESTIÓN PERICIAL TOXICOLOGÍA FORENSE
Nombre del instructivo:	INSTRUCTIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS POR CROMATOGRFÍA DE GASES- MASAS COMO MÉTODO CONFIRMATORIO.
Código del instructivo:	SNMLCF-ML-TOXICOLOGÍA-07
Descripción:	PROPÓSITO: Estandarizar la determinación de plaguicidas: organofosforados y carbamatos por Cromatografía de Gases – Masas, como método de confirmación. ALCANCE: Se aplica en muestras biológicas (sangre, suero, contenido gástrico, vómito y vísceras) y no biológicas (alimentos, bebidas, medicamentos, entre otros) relacionados con el hecho de interés criminalístico.
Responsable:	Jefe de la gestión pericial y peritos acreditados de la Gestión de Toxicología Forense del Servicio Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses.
Marco Legal:	1. CONSTITUCIÓN DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR. ➤ Art. 195. La Fiscalía General del Estado. ➤ Art. 233. Deberes de servidores públicos. 2. CÓDIGO ORGÁNICO INTEGRAL PENAL. ➤ Art. 292. Alteración de evidencias y elementos de prueba. ➤ Art.448. Organización y Dirección. ➤ Art. 449. Atribuciones. Numerales 8 y 9. ➤ Art. 456. Cadena de Custodia. ➤ Art. 458. Preservación de la escena del hecho o indicios ➤ Art. 459. Actuaciones y Técnicas Especiales de Investigación. Numeral 1.



➤ **Art. 463.**

Obtención de muestras.

➤ **Art. 498.**

Medios de prueba.

➤ **Art. 511.**

Reglas Generales.

3. DECRETO EJECUTIVO N°759. Reglamento de Coordinación Interinstitucional para la Organización, Dirección, Administración y Operación del Sistema Especializado Integral de Investigación, Medicina Legal y Ciencias Forenses.

➤ **Art.13**

Director General del Servicio Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, **numeral:** 5

➤ **Art. 14.**

Atribuciones del Servicio Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, **numeral:** 1, 2, 4,5.

4. RESOLUCIÓN N° 040-2014. Reglamento del Sistema Pericial Integral de la Función Judicial.

➤ **Capítulos:** 2, 3,4 y 5.

5. RESOLUCIÓN N°073-FGE-2014. Suplemento del Registro Oficial 318,25-VIII-2014.

Acápites: Manual de Química y Toxicología Forense.

Lineamientos:

- El instructivo es "RESTRINGIDO" y de uso exclusivo del Laboratorio de Criminalística y Ciencias Forenses de Pichincha-Quito en su gestión interna Toxicología Forense.
- El instructivo es de "USO OBLIGATORIO" para el personal de la gestión interna Toxicología. Forense.
- Es responsabilidad del Jefe de la gestión interna Toxicología Forense garantizar la aplicación y el cumplimiento del presente instructivo.
- Se prohíbe la reproducción total o parcial del instructivo sin autorización expresa.

2. GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS.

2.1. GLOSARIO DE TÉRMINOS.

- **Carbamatos:** plaguicida de acción análoga a los compuestos Órganofosforados (OP) al causar una disminución de la actividad de la colinesterasa, pero la unión al sitio activo de la enzima colinesterasa es reversible. Consecuentemente, aunque los síntomas son prácticamente idénticos a los del envenenamiento por OP, tienen una duración específica. (Jickells, 2008)

- **Muestra biológica:** "espécimen sobre el cual se realizará el análisis toxicológico de rutina, cuya adquisición, almacenamiento y transporte al laboratorio se han documentado adecuadamente para garantizar la debida cadena de custodia." (Jickells, 2008)
- **Órganofosforado:** "grupo de plaguicidas, se usan en agricultura principalmente para el control de insectos de cuerpo blando y su toxicidad para los seres humanos varía según el compuesto." (Fiorenza, 2007)
- **Pruebas confirmatorias:** "pruebas realizadas a través de métodos instrumentales más modernos para la separación y determinación de especies químicas, tal como técnicas cromatográficas que complementan a los análisis clásicos previos de destilación, extracción y precipitación, con la finalidad de corroborar los resultados preliminares."

2.2. ABREVIATURAS.

- **Conc. :**Concentrado.
- **SNMLCF:** Servicio Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses.
- **GC-MS:** Cromatografía de Gases-Masas.

3. DESCRIPCIÓN DEL INSTRUCTIVO.

3.1. FUNDAMENTO TEÓRICO.

El término "plaguicida" abarca una amplia variedad de sustancias utilizadas para destruir formas de vida no deseadas. Más de mil plaguicidas están disponibles y se utilizan ampliamente en la actualidad. Estos juegan un papel importante en la toxicología clínica y forense como causas de intoxicaciones suicidas, homicidas y accidentales. (Jickells, 2008)

El Laboratorio de Criminalística y Ciencias Forenses de Pichincha-Quito en su Gestión Toxicología Forense, se encarga de la determinación de un número significativo de estos, tales como: Órganofosforados y carbamatos. Para lograrlo, entre las técnicas utilizadas se emplea la Cromatografía de Gases-Masas, en la cual la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica.

Esta técnica es capaz de proporcionar información acerca de:

1. Composición elemental de las muestras;
2. Estructura de las moléculas inorgánicas, orgánicas y biológicas;
3. Composición cualitativa y cuantitativa de mezclas complejas;
4. Estructura y composición de superficies solidas; y,
5. Relaciones isotópicas de átomos en las muestras. (Skoog, 1992)

3.2. EQUIPOS, MATERIALES, REACTIVOS Y CONDICIONES AMBIENTALES.

3.2.1. EQUIPOS:

- Sorbona; y,
- Cromatógrafo de gases- masas.



3.2.2. MATERIAL DE LABORATORIO:

- Pipetas: serológicas y pasteur;
- Vasos de precipitación; y,
- Vial 2 ml screw thread GC-MS.

3.2.3. REACTIVOS Y ESTÁNDARES DE REFERENCIA: corresponden a:

3.2.3.1. REACTIVOS.

- N-Hexano.

3.2.3.2. ESTÁNDARES/PATRÓN:

- Para Organofosforados: Acefate y Malathion; y,
- Para Carbamatos: Estándar de Referencia Carbamate Pesticide Calibration Mixture marca RESTEK.

3.2.4. MATERIALES VARIOS:

- Guantes desechables; y,
- Papel absorbente.

3.2.5. CONDICIONES AMBIENTALES:

- Ver: Instructivo para el control de temperatura.

3.3. MANEJO DE INDICIOS Y MUESTRAS:

3.3.1. TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO:

- Ver: Instructivo para Transporte, Almacenamiento y Conservación de Indicios.

3.3.2. PREPARACIÓN, Y MANIPULACIÓN:

- Ver: Protocolo de Toma, Conservación y Recepción de Muestras Biológicas para Análisis Toxicológicos.

3.4. PROCEDIMIENTO:

El procedimiento considerado para el desarrollo de este ensayo, debe obedecer a lo siguiente:

Realizar el procedimiento de extracción según lo describe el instructivo:
"DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA COMO MÉTODO DE



ORIENTACIÓN/CONFIRMACIÓN.", apartado 3.4.2., 3.4.3 y 3.4.4., posteriormente:

- Reconstituir el residuo que se obtuvo de la extracción con éter etílico o N-Hexano.
- Colocar en el Vial 2 ml EL RESIDUO RE CONSTITUIDO.
- Realizar un lavado de la columna del CG-MS con metanol grado P.A esto previo al análisis de la muestra.
- Colocar cloroformo o N-Hexano en los viales para lavado de la aguja de inyección.
- Llevar los viales al equipo de CG-MS e inyectar la muestra con el método específico para el análisis de plaguicidas PEST-RE.

***Nota Técnica:** las condiciones generales del equipo para el desarrollo del ensayo, así como, las ilustraciones orientativas inherentes a los espectros por sustancias podrán ser observadas en el campo de anexo.*

3.5. MÉTODO DE CÁLCULO:

N/A

3.6. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

Los resultados serán estipulados de conformidad a lo siguiente:

- Seleccionar la muestra corrida en el equipo.
- Seleccionar el icono "view" y posteriormente la opción "Chromatogram".
- Observar el cromatograma de la muestra analizada
- Cotejar el cromatograma de la muestra con el cromatograma del estándar.
- Identificar el "pico" de la sustancia sujeto de análisis.
- Seleccionar el "pico" a analizar y observe el espectro
- Verificar las masas correspondientes a la sustancia sujeto de análisis.
- Seleccionar el icono de librería y haga una revisión de las posibles sustancias correspondientes al pico analizado.
- Verificar que el porcentaje de identificación de la sustancia sea mayor a 800 puntos porcentuales.

4. NORMAS DE SEGURIDAD.

Considere lo estipulado en la Resolución N°073-FGE-2014. Suplemento del Registro Oficial 318.25-VIII-2014, acápite: Manual de Bioseguridad.



5. BIBLIOGRAFÍA.

- Fiorenza, G. (2007). Manual de Procedimientos Analíticos Toxicológicos para Laboratorios de Baja Complejidad. Buenos Aires.
- Jickells, S. (2008). Clarke's Analytical Forensic Toxicology. Londres: Pharmaceutical Press.
- Skoog, D. y. (1992). Principios de Análisis Instrumental. Madrid: Mc Graw Hill.

6. ANEXOS.

ILUSTRACIÓN 1 CONDICIONES DEL CROMATÓGRAFO DE GASES MASAS.

GC Control

Instrument Name : inst1	Injection : AUTO	Inlet A : PSSI
Experiment Time : 30.00 min	Injection Volume : 2.0 µL	Inlet B : NONE
Delay Time : 0.00 min	Sampling Rate : 1.56250 pts/s	Detector A : NONE
Run Time : 30.00 min	Channel : NONE	Detector B : NONE

Oven Temperature Program :

Initial Temperature : 75 deg for 1.00 min
Ramp 1 : 15.0 deg/min to 175 deg, hold for 0.00 min
Ramp 2 : 5.0 deg/min to 225 deg, hold for 0.00 min
Ramp 3 : 25.0 deg/min to 290 deg, hold for 9.73 min

ILUSTRACIÓN 2 CONDICIONES DEL AUTOSAMPLER DEL CG-MS.

Instrument Control

Autosampler | Oven/Inlets | Camera | Detectors | Instrument Timed Events |

Injection Source
 Manual Autosampler

Sample Injection

Syringe capacity (µL)	5.0	Sample pumps	6
Injection volume (µL)	2.0	Velocity delay	0
Injection speed	Normal	Wash/waste vial set.	1

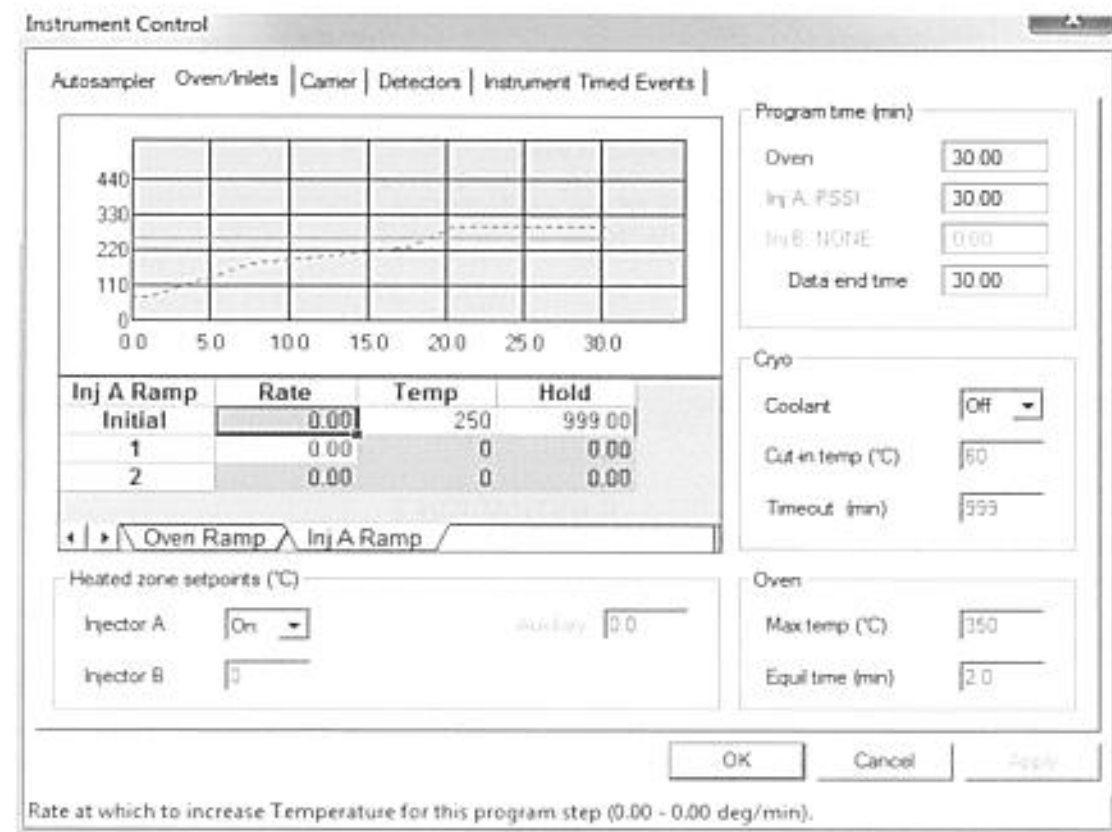
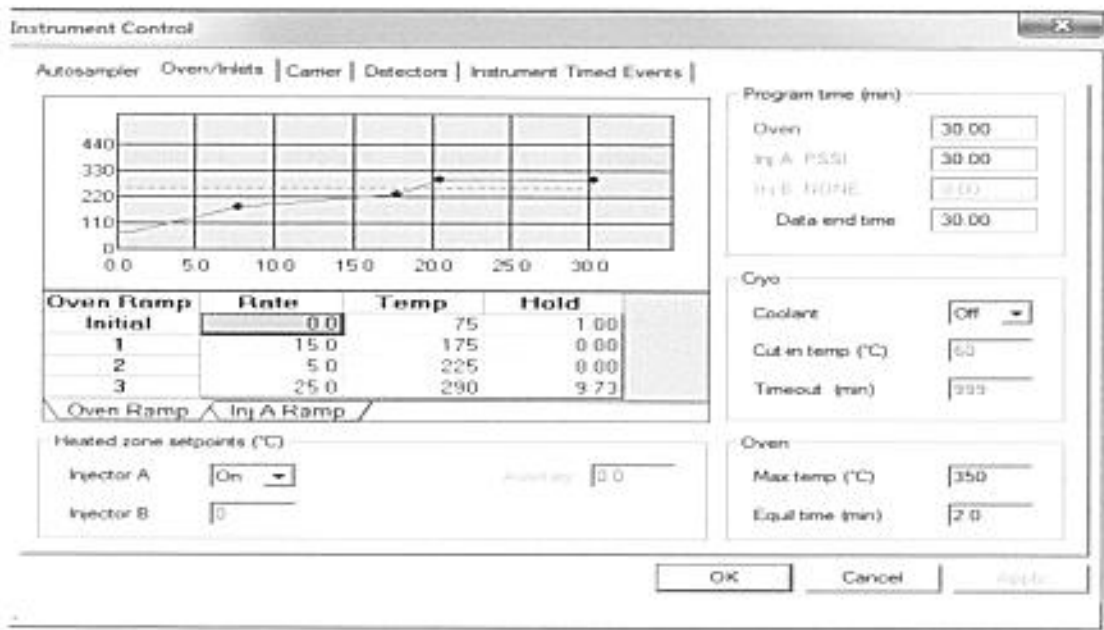
Washes

Pre-injection solvent washes	2
Pre-injection sample washes	2
Post-injection solvent washes (A)	6
Post-injection solvent washes (B)	-

OK Cancel Help

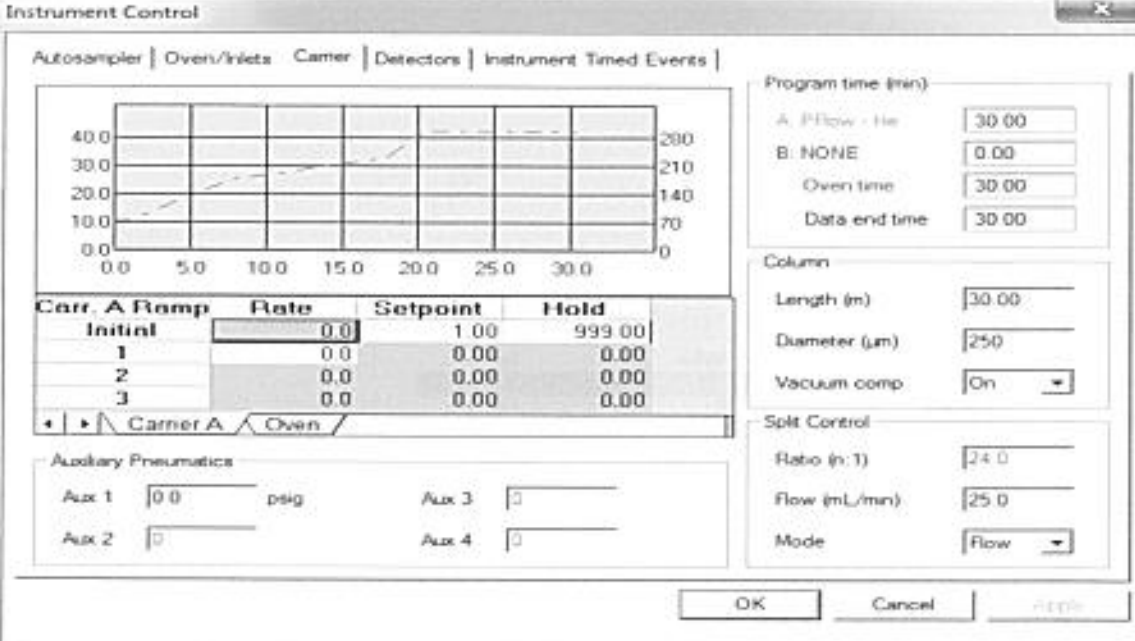
The autosampler will be used

ILUSTRACIÓN 3 CONDICIONES DEL HORNO (RAMPA DE TEMPERATURAS) DEL CG-MS



Rate at which to increase Temperature for this program step (0.00 - 0.00 deg/min).

ILUSTRACIÓN 4 CONDICIONES DEL CARRIER (TRAMPA DE TEMPERATURAS) DEL CG-MS



Instrument Control
 Autosampler | Oven/Inlets | **Carrier** | Detectors | Instrument Timed Events

Program time (min):
 A. PFlow - He: 30.00
 B. NONE: 0.00
 Oven time: 30.00
 Data end time: 30.00

Carr. A Ramp	Rate	Setpoint	Hold
Initial	0.0	1.00	999.00
1	0.0	0.00	0.00
2	0.0	0.00	0.00
3	0.0	0.00	0.00

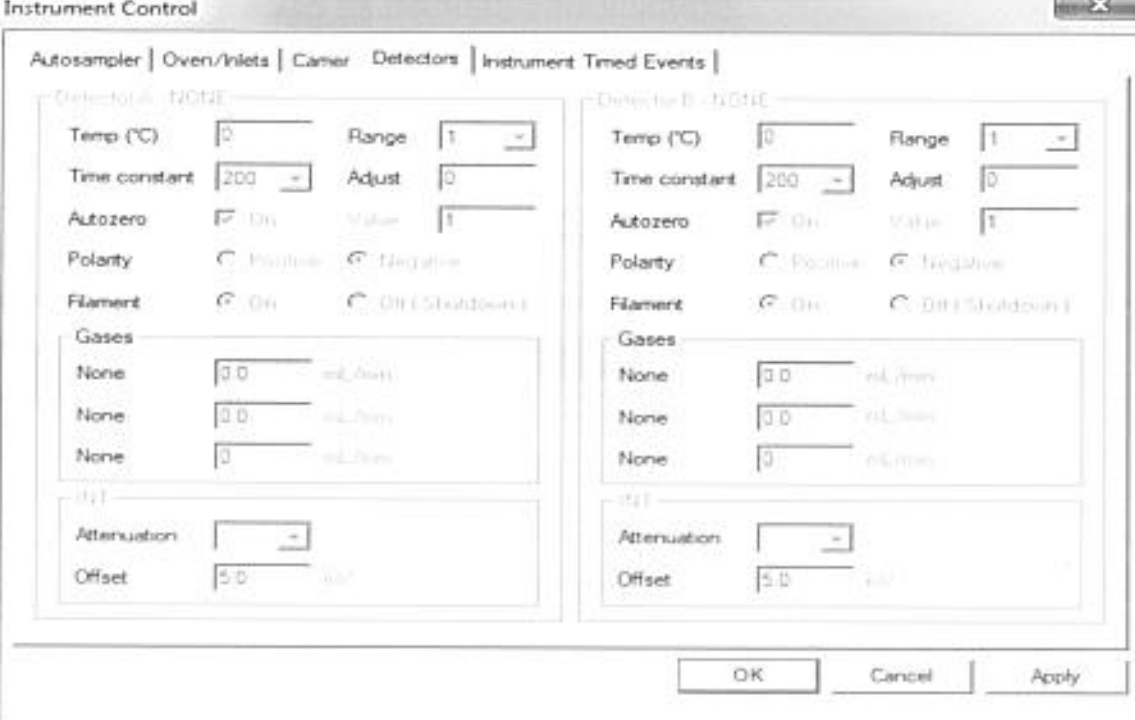
Column:
 Length (m): 30.00
 Diameter (µm): 250
 Vacuum comp: On

Split Control:
 Ratio (n:1): 24.0
 Flow (mL/min): 25.0
 Mode: Flow

Auxiliary Pneumatics:
 Aux 1: 0.0 psig Aux 3: 0
 Aux 2: 0 Aux 4: 0

OK Cancel Apply

ILUSTRACIÓN 5 CONDICIONES DEL DETECTOR DEL CG-MS



Instrument Control
 Autosampler | Oven/Inlets | Carrier | **Detectors** | Instrument Timed Events

Detector A: NONE
 Temp (°C): 0 Range: 1
 Time constant: 200 Adjust: 0
 Autozero: On Value: 1
 Polarity: Positive Negative
 Filament: On Off (Skatdown)

Gases:
 None: 0.0 mL/min
 None: 0.0 mL/min
 None: 0 mL/min

Attenuation: - Offset: 5.0

Detector B: NONE
 Temp (°C): 0 Range: 1
 Time constant: 200 Adjust: 0
 Autozero: On Value: 1
 Polarity: Positive Negative
 Filament: On Off (Skatdown)

Gases:
 None: 0.0 mL/min
 None: 0.0 mL/min
 None: 0 mL/min

Attenuation: - Offset: 5.0

OK Cancel Apply



ILUSTRACIÓN 6 CONDICIONES DEL TIEMPO DE EVENTOS DEL CG-MS

The screenshot shows the 'Instrument Control' window with the 'Instrument Timed Events' tab selected. The interface includes input fields for 'Time (min)' (0.70), 'Event' (SPL 1), and 'Value' (0). On the right, there are buttons for 'Add', 'Delete', 'Replace', and 'Clear List'. Below these are two tables: 'Defined Events' and 'Valves'.

Event	Value	Time
SPL1	0	-0.70
CAR1	2	-0.65
SPL1	50	1.50
CAR1	1	1.55

Valves	Initial Setting
1. SPLIT	<input checked="" type="radio"/> On <input type="radio"/> Off
2. NONE	<input type="radio"/> On <input type="radio"/> Off
3. VALVE	<input type="radio"/> On <input checked="" type="radio"/> Off
4. NONE	<input type="radio"/> On <input type="radio"/> Off
5. NONE	<input type="radio"/> On <input type="radio"/> Off
6. NONE	<input type="radio"/> On <input type="radio"/> Off

Buttons at the bottom: OK, Cancel, Apply.

ILUSTRACIÓN 7 CONDICIONES GENERALES DEL MS

The screenshot shows the MS software interface. At the top, it displays 'Solvent Delay' and 'One Solvent Delay'. Below this are icons for 'MS Scan' and 'SP'. A 'Total Run Time' of 30:00 is shown. The main area displays a chromatogram with a peak at 2.40 minutes. The scan parameters are: 'MS Scan, Time 2.40 to 30.00, Mass 50.00 to 400.00 E+'.

ILUSTRACIÓN 8
CROMATOGRAMA ORIENTATIVO PARA ORGANOFOSFORADOS.

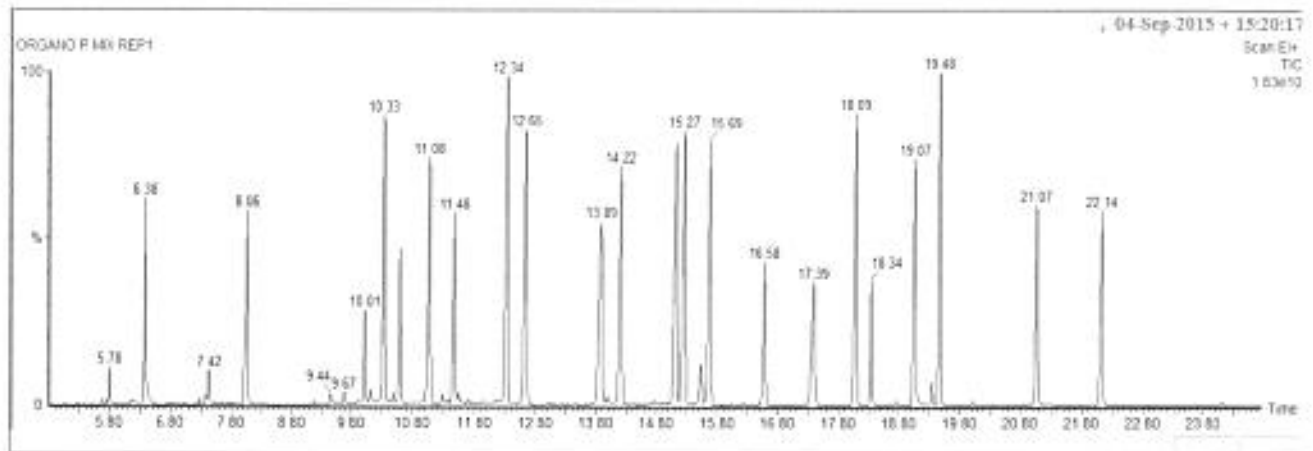


TABLA 1
BITÁCORA ORIENTATIVA PARA ORGANOFOSFORADOS.

COMPUESTO	MÉTODO	TIEMPO RETENCIÓN	MASAS	BIBLIOGRAFÍA
DICHLORVOS	PEST- REV	6,3	109-185-220- 222	STANDARD METHODS
MEVINPHOS	PEST- REV	8	69-109-127- 131-192-219	STANDARD METHODS
DEMETON O & S	PEST- REV	9,1	80-88-89-171	STANDARD METHODS
ETHOPROPHOS	PEST- REV	10,3	158-200-242	STANDARD METHODS
NALED	PEST- REV	10,6	109-145-185	STANDARD METHODS
PHORATE	PEST- REV	11	75-121-260	STANDARD METHODS
DIAZINON	PEST- REV	12,3	144-179-304	STANDARD METHODS
DISULFOTON	PEST- REV	12,6	88-97-274	STANDARD METHODS
METHYL PARATHION	PEST- REV	13,8	109-125-263	STANDARD METHODS
FENCHLORPHOS (RONNEL)	PEST- REV	14,2	285-287-125	STANDARD METHODS
FENTHION	PEST- REV	15,1	125-169-278	STANDARD METHODS
CHLORPYRIFOS	PEST- REV	15,2	144-197-314	STANDARD METHODS



TRICHLORONATE	PEST-REV	15,6	137-269-297	STANDARD METHODS
MERPHOS	PEST-REV	16,5	153-209-298	STANDARD METHODS
SIROFOS (TETRACHLORVINPHOS)	PEST-REV	17,4	330-331-333	STANDARD METHODS
PROTHIOFOS	PEST-REV	18	113-155-162-267	STANDARD METHODS
FENSULFOTHION	PEST-REV	19	125-141-153-293	STANDARD METHODS
SULPROFOS	PEST-REV	19,4	113-139-156	STANDARD METHODS
AZINPHOS METHYL	PEST-REV	21	77-132-160	STANDARD METHODS
COUMAPHOS	PEST-REV	22,1	97-210-226	STANDARD METHODS

ILUSTRACIÓN 9
CROMATOGRAMA ORIENTATIVO PARA CARBAMATOS.

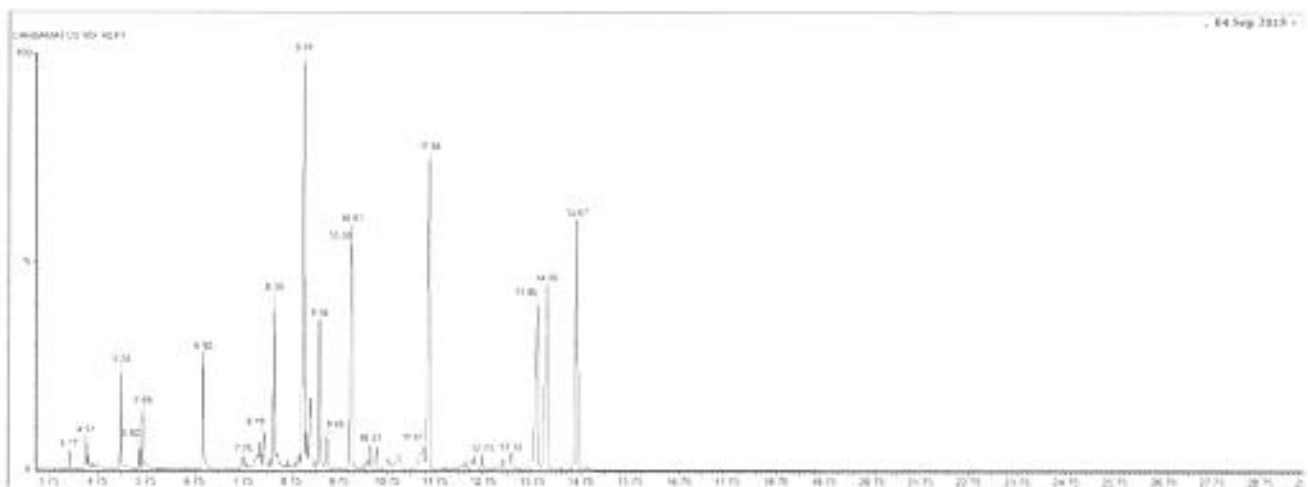


TABLA 2
BITÁCORA ORIENTATIVA PARA CARBAMATOS

COMPUESTO	MÉTODO	TIEMPO RETENCIÓN	MASAS	BIBLIOGRAFÍA
ALDICARB SULFOXIDO	PEST-REV		58-76-86-100-144	STANDARD METHODS
ALDICARB SULFONE	PEST-REV			STANDARD METHODS
OXAMYL	PEST-REV		72-99-115-145-162	STANDARD METHODS
METHOMYL	PEST-REV		58-88-105	STANDARD METHODS



3- HYDROXYCARBOFURAN	PEST-REV	13.85	137-147-180	STANDARD METHODS
ALDICARB	PEST-REV		58-76-86-100-144	STANDARD METHODS
PROPOXUR	PEST-REV	9.99	69-110-111-131- 152-219-264	STANDARD METHODS
CARBOFURAN	PEST-REV	11.60	58-123-131-149- 164-221	STANDARD METHODS
CARBARYL	PEST-REV	9.01	63-89-115-116- 144-201	STANDARD METHODS
NAPHTHOL	PEST-REV	14.05	63-74-84-115-116- 144	STANDARD METHODS
METHIOCARB	PEST-REV	14.64	109-153-168	STANDARD METHODS



TRAZABILIDAD DEL DOCUMENTO, COPIAS Y COMPULSAS.

No. de Versión	No. de Copias Distribuidas	Nombre de la persona que recibe	Firma	Fecha	Firma del SGC - Devolución