

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
“ZARAGOZA”**



“DETECCIÓN DE PARAQUAT EN FLUIDOS BIOLÓGICOS”

TESINA

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO

Presenta.
Bello Sánchez Gerardo Uriel

Asesor del proyecto: QFB. Estela Valencia Plata



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	1
3. Marco teórico.....	3
3.1. Antecedentes.....	3
3.2. Presentaciones Comerciales.....	4
3.3. Características Físico-Químicas.....	5
4. Toxicidad.....	6
4.1 Tipos de Toxicidad.....	6
4.1.1. Toxicidad Aguda.....	6
4.1.2. Toxicidad Crónica.....	7
4.2. Efectos en el medio Ambiente.....	8
5. Toxicocinética.....	9
5.1. Absorción.....	9
5.2. Distribución.....	9
5.3. Metabolismo.....	10
5.4. Eliminación.....	10
6. Mecanismo de Acción.....	11
7. Manifestaciones Clínicas.....	12
8. Problemática.....	14
9. Metodología.....	15
9.1. Problema.....	15
9.2. Hipótesis.....	15
9.3. Objetivos.....	15
9.4. Tipo de estudio.....	15
10. Descripción de técnicas y métodos para determinar <i>Paraquat</i>	16
11. Técnicas y Metodología.....	17
11.1. Prueba del Ditionito de sodio.....	17
11.2. Método para determinar <i>Paraquat</i> en orina utilizando un Espectrofotómetro de UV – Visible.....	17

11.2.1. Fundamento del Espectrofotómetro de UV – Visible.....	17
11.3. Método para determinar <i>Paraquat</i> en plasma sanguíneo usando un detector de par de iones.....	19
11.3.1. Fundamento del HPLC	19
11.4. Determinación de <i>Paraquat</i> por Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones (^1H RMN) en orina.....	21
11.4.1. Fundamento de (^1H RMN).....	21
12. Resultados.....	24
13. Conclusiones.....	25
14. Referencias Bibliográficas.....	26

“DETECCIÓN DE PARAQUAT EN FLUIDOS BIOLÓGICOS”

1. RESUMEN

Debido a que el *Paraquat* es altamente tóxico y a que puede causar la muerte a un ser humano en pocas horas, es necesario contar con un método efectivo para determinarlo, siendo los fluidos biológicos la mejor vía para su identificación. En este trabajo se evaluó cada una de las técnicas analíticas y así determinamos la más rápida y confiable para su detección, esto se logró mediante la revisión bibliográfica (de artículos, libros, normas, etc.) ya que el *Paraquat* es uno de los herbicidas más utilizados en la actualidad.

2. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, se ha avanzado bastante en el control del uso y comercio de dichos agroquímicos. Sin duda, estas medidas han permitido una reducción relativa del impacto negativo de estos productos en el ambiente y la salud. Sin embargo, y a pesar de estos esfuerzos, la cantidad de intoxicaciones con pesticidas sigue aumentando en el Mundo.

Se conocerán las diferentes técnicas y métodos que existen para detectar rápidamente el *Paraquat*, el cual es un herbicida muy utilizado en todo el mundo (más de 130 países lo emplean), que posee una toxicidad muy alta. Debido a esto muchas personas lo utilizan para suicidios y aun algunos casos para homicidios, especialmente en los países del (llamado) tercer mundo (OMS, 1990).

Este producto es sumamente tóxico para el ser humano cuando es ingerido y, provoca daños graves en los pulmones, riñones e hígado. La muerte provocada por una intoxicación aguda con *Paraquat* se debe generalmente a lesiones irreversibles en los pulmones. Cabe señalar que, hasta la fecha, no se conoce antídoto ni tratamiento eficaz para controlar un envenenamiento con este producto. Nadie sabe con exactitud cuántas muertes fueron provocadas por este herbicida desde que entró en el mercado en 1962, pero se estima que son varios miles.

Los "defensores" del uso del *Paraquat* argumentan que su peligro se limita a la ingestión intencional del producto concentrado (suicidio). Según la empresa ZENECA, fabricante del producto, el hecho de haber añadido, a partir de 1987, un colorante azul, un aditivo maloliente y otro aditivo emético (que provoca vómito), eliminan potencialmente la posibilidad de un envenenamiento oral accidental (Zeneca Chemicals, 1993).

Este plaguicida es el responsable de una alta Morbi-Mortalidad, solo es superada por la intoxicación con Fosforo de Aluminio. Por lo que el médico y el químico deben de estar preparados para enfrentar los casos de intoxicaciones por este plaguicida.

Abordaremos diferentes técnicas como: Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), Espectroscopia de masas (EM), Resonancia magnética nuclear de protones (RMN¹H), Espectroscopia de Infrarrojo de fourier (FT-IR) entre otras.

3. MARCO TEORICO

3.1. Antecedentes.

Los herbicidas son compuestos químicos utilizados por el hombre para luchar contra las malas hierbas (plantas no deseadas por el agricultor, que afectan el desarrollo de la cosecha). Estas sustancias son tóxicas para el hombre variando ampliamente de un tipo a otro de herbicida, en su mecanismo de acción, su potencia, etc. (8)

El *Paraquat* es un herbicida de contacto, de amplio espectro perteneciente a la familia de los Bipyridilos, utilizado mundialmente desde 1969. Fue sintetizado en 1882, pero su actividad se descubrió hasta 1959. (6,8)

El *Paraquat* es un herbicida del tipo Bipyridilo que se presenta en forma líquida en concentraciones del 20% al 40% para uso agrícola. Su nombre químico es: 1,1'-dimetil-4,4'-bipyridilo (Figura 1).

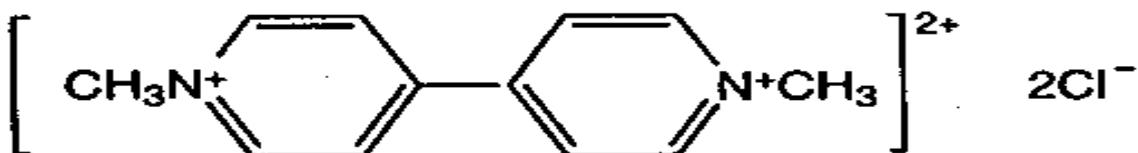


Figura 1. Estructura del paraquat. (1-1' dimetil, 4-4' bipyridilium ion (clorhidrato)).

De las familias de herbicidas, una de las más utilizadas y de mayor interés toxicológico para el hombre, es la constituida por los compuestos bipyridílicos, cuyos derivados más importantes son el *Paraquat*, el *Diquat* y el *Morfanquat*, siendo éste primero el más empleado. (8)

3.2. Presentaciones comerciales.

El *Paraquat* es una sustancia química sintética utilizada como herbicida. Su nombre comercial más conocido es "Gramoxone" pero, también es comercializado bajo otras marcas como son (1,16):

ACTOR	FEDEXONE	INVERQUAT
AGROQUAT	FORMUQUAT	KAYQUAT
ATILA	FUEGO	K-QUAT
CEKUQUAT	GOLDQUAT	MALEXON
CHAPEADOR	GRAMECOOP	PILARXONE
CRISQUAT	GRAMINEX	PREGNONE
DAVIQUAT	GRAMOCIL	QUATZONE
DEXURON	GRAMONOL	RADEX-D
CAFESAQUAT	GRAMOXONE	SERAXONE
CASUKU	GRAMURAN	SERQUAT
ESCOPETA	HERBAXONE	ULTRAGRASS
ESGRAM	HERBIQUAT	WEEDOL
EXPRONE	HERQUAT	

Tabla 1. Nombres comerciales del paraquat.



Figura 2. Presentaciones comerciales del Paraquat

En su presentación comercial el *Paraquat* es un líquido oscuro altamente soluble en agua pero poco volátil. Bajo condiciones adecuadas de almacenamiento, este producto se conserva indefinidamente.

Cuando se aplica en los campos, el *Paraquat* que cae en el suelo es rápida y fuertemente adsorbido por las partículas de tierra, especialmente las de arcilla. Estos residuos ligados a la tierra no pueden ser absorbidos por las plantas, las lombrices de tierra ni los microorganismos.

Debido a esta característica, el *Paraquat* tiene una media vida larga en el suelo: desde 16 meses (estudios en laboratorio, condiciones aeróbicas) hasta 13 años (estudio de campo).

El *Paraquat* no es móvil en suelos arcillosos ni en suelos arenosos. Además que no es adsorbido por las partículas de tierra puede ser descompuesto por las bacterias del suelo en un producto final no-tóxico.

En el agua, los residuos de *Paraquat* son adsorbidos por los lodos o absorbidos por las plantas acuáticas. Estudios de laboratorio han demostrado que la media vida del *Paraquat* en el agua puede variar de 13.1 horas hasta 23 semanas.

3.3. Características Físico-Químicas.

Para observar sus principales propiedades físico-químicas ver tabla 2.

Punto de fusión	175-180 °C
Punto de ebullición	300 °C con descomposición
Solubilidad en agua a 20 °C	700 g.L-1
pH de la formulación líquida	6.5-7.5

Tabla 2. Propiedades Físico-químicas del *Paraquat*

Otras características físico-químicas son:

- Compuesto polar
- Se presenta en forma de sales de cloruros ($C_{12}H_{14}N_2Cl_2$) o dimetilsulfatos ($C_{12}H_{14}N_2(CH_3SO_4)_2$)
- Se ioniza rápidamente
- El *Paraquat* se reduce cediendo un solo electrón para formar un radical catiónico.

Los rayos ultravioleta y la luz solar en general descomponen el *Paraquat* en productos menos tóxicos. Sin embargo, como este herbicida es rápidamente adsorbido por el suelo, las moléculas ligadas resisten a la fotodescomposición. Es así que no se observó degradación de *Paraquat* después de 2 años de exposición a la luz natural en un suelo arenoso fumigado superficialmente con este producto.

4. TOXICIDAD

La dosis Letal para hombre se ha calculado en aproximadamente 35 mg/kg. Niveles plasmáticos mayores de 2mg/l resultan fatales para el hombre. (4)

La ingestión de tan sólo 2-4 gr o hasta 20 mL de una solución concentrada al 20% ha resultado en una muerte segura a través de varios días, (en los que algunos de sus órganos dejan de funcionar, principalmente riñones y pulmones). Con una ingestión de 60 mL ó más (de una solución saturada), el inicio de la toxicidad y muerte es más rápido aproximadamente de 12 a 18 horas dependiendo de la concentración. (4,7)

El *Paraquat* pertenece a la "Docena Sucia", lista de los 12 pesticidas que por su peligrosidad deberían estar prohibidos según la red mundial "Pesticid Action Network" (PAN). Este herbicida es prohibido en varios países como Austria, Bulgaria, Dinamarca, Finlandia, Moldavia, Suecia, Burkina Faso, Argentina, República Dominicana y, es de uso restringido (quiere decir que se necesita la "receta" de un profesional para comprarlo y sólo puede ser aplicado por un operario certificado) en los Estados Unidos y Alemania.

4.1. Tipos de toxicidad.

4.1.1. Toxicidad aguda.

En seres humanos, la ingestión de 35mg/kg de peso corporal es letal (11), o sea, una persona que pesa 65 kg. Muere después de ingerir 2.2 gramos de *Paraquat*. Si se ingiere *Paraquat* en dosis menores, se presentan frecuentemente quemaduras en la boca y en la garganta seguidas de una irritación grave del tracto gastrointestinal que provoca dolores abdominales, náuseas, vómitos y diarrea. Otros síntomas incluyen sed, respiración corta y frecuencia cardíaca acelerada. Como otros efectos tóxicos se puede añadir lesiones en los riñones, hígado y corazón así como daños y sangrados en los pulmones.

Una característica de la intoxicación aguda con *Paraquat* es que algunos síntomas pueden aparecer varios días después de la exposición al tóxico. Los tejidos pulmonares acumulan más el *Paraquat* que los de otros órganos.

Las personas con problemas pulmonares son más susceptibles al producto. Si se inhala *Paraquat*, se puede producir sangrado en la nariz e irritación pulmonar. Debido a su poca volatilidad, estas intoxicaciones no son frecuentes y ocurren solamente cuando se fumiga el producto contra el viento y sin protección.

El contacto con la piel puede causar quemaduras, dermatitis y daños en las uñas. La LD 50 dérmica en conejos es de 236 hasta 325 mg/kg (3). El contacto con los ojos puede irritar, quemar y causar daños a la cornea.

El *Paraquat* no es absorbido rápidamente por el estómago y todavía más lentamente por la piel sana. Varios estudios indican que si la piel está dañada o irritada, puede absorber muy fácilmente *Paraquat* (2). Los metabolitos formados por el *Paraquat* en el estómago son absorbidos rápidamente pero se desconoce su toxicidad (12). Cuando *Paraquat* se concentra en los tejidos de los pulmones, se transforma en subproductos altamente tóxicos (3).

En un estudio con animales de granja intencionalmente intoxicados con *Paraquat*, se observó que los animales excretaron un 90% del herbicida administrado oralmente después de algunos días. El *Paraquat* fue levemente absorbido y metabolizado en el tracto gastrointestinal. Se detectaron pequeñas cantidades de metabolitos en la leche y los huevos (12).

4.1.2. Toxicidad crónica.

Existen estudios realizados o encargados por empresas que producen o comercializan el *Paraquat* que -por supuesto- indican que *Paraquat* no provoca efectos negativos en la salud a largo plazo.

Sin embargo, se encontró un estudio realizado en humanos, que concluye que esta sustancia tiene efectos tóxicos crónicos: el Gramoxone tiene efecto mutagénico en los linfocitos humanos (13).

En cambio, los efectos crónicos en otros organismos vivos han sido bien documentados, entre otros, podemos mencionar:

- Efectos neurotóxicos en embriones de ratón con efecto permanente.
- Genotóxicidad en ratones (malformaciones en los espermatozoides).
- Gramoxone tiene efectos mutagénicos en las células de *Allium cepa* y *Vicia fabia*.
- En ratas, *Paraquat* provoca malformaciones permanentes en los pulmones.

Además de estos efectos, hay que señalar que los operarios de bomba de espalda (personas que realizan la aplicación del herbicida en el campo) que aplican *Paraquat* sufren a menudo de sangrado de la nariz, entre otros ver tabla 3.

Fulminante : ingesta > 50 mg/Kg	Fallo multisistémico y muerte
Aguda : ingesta 20-40 mg/Kg	Fase gastrointestinal, fase hepatorenal y fibrosis pulmonar
Crónica	Parkinsonismo irreversible

Tabla 3. Características de la intoxicación por *Paraquat*

4.2. Efectos en el medio ambiente

El *Paraquat* es desde moderada hasta altamente tóxico para muchas especies acuáticas. Las plantas acuáticas pueden ser una fuente de bioacumulación. En efecto, en un estudio, resultó que cuatro días después de aplicar *Paraquat* como herbicida acuático, las plantas analizadas presentaban niveles significativos de residuos del producto (11).

Por otro lado, el *Paraquat* tiene efectos altamente embriotóxicos en anfibios. Un estudio de la Universidad de Milano, Italia, concluye que *Paraquat* no solamente provoca la muerte de los renacuajos sino además, muchos de ellos presentaban malformaciones (17). Esta última observación pone en duda la supuesta no teratogenicidad de *Paraquat*.

5. TOXICOCINÉTICA

La toxicocinética es el estudio de la velocidad de cambio de la concentración de las especies tóxicas dentro del organismo. En otras palabras estudia el comportamiento del toxico dentro del organismo y todos los cambio que alli ocurren hasta su eliminación.

Abarca los procesos de absorción, distribución, metabolismo o biotransformación y su eliminación (ADME)

5.1. Absorción.

La principal vía de absorción es oral, aunque también se han encontrado casos de intoxicación por vía dérmica y aérea aunque es muy poco frecuente, sin embargo la absorción se ve incrementada cuando existen lesiones dérmicas, que permiten el fácil ingreso al organismo. El contacto del paraquat con la piel sana, daña la dermis, lo que permite que se absorba más fácilmente. (4,7)

5.2. Distribución.

En esta fase se observa la distribución por todos los órganos y tejidos, con excepción del cerebro y medula. No obstante, hay dos órganos en los que el paraquat se fija de modo especial: el pulmón y el riñón. (4)

Pico plasmático.	1 hora postingesta.
Vida media plasmática.	5 horas.
Vida media de eliminación.	12-120 horas. Media de 84 horas.
Volumen de distribución.	2-8 l/Kg (es amplio).
Distribución.	Amplio.

Tabla 4. Distribución del Paraquat

La concentración selectiva del paraquat en pulmón, puede alcanzar cifras de 10-15 veces superior a la del plasma, esto se debe a un mecanismo de transporte activo, con enlaces covalentes a las proteínas plasmaticas, hasta llegar a los neumocitos I y II. Siendo principalmente los neumocitos II las células diana del paraquat. (4)

5.3. Metabolismo.

El paraquat no sufre ningún proceso de biotransformación a través de su paso por el organismo humano. (4)

5.4. Eliminación.

Este herbicida se excreta principalmente por el riñón y una pequeña parte en las heces fecales, la cual persiste por semanas. El mecanismo de excreción es doble: por filtrado glomerular y por secreción tubular activa. El hombre en promedio elimina el 70-80% aproximadamente en 48 horas y el resto en 2 o 3 semanas.

Hay que destacar los siguientes estudios y mencionar que fueron desarrollados en animales de laboratorio.

El clearance de eliminación o depuración es de aproximadamente 20ml/min y la dosis letal para hombre se ha calculado en 35 mg/kg. (4)

Se excreta por riñón en tres días aproximadamente el 98% del paraquat absorbido, quedando restos en sangre durante una semana. (16)

6. MECANISMO DE ACCIÓN

El daño causado por el paraquat iónico se debe principalmente a la peroxidación lipídica, lo que produce:

1. Se inhibe el paso de NADP a NADPH, produciendo una depresión pulmonar y al mismo tiempo interfiere en el transporte de electrones para la formación de energía.
2. Se generan radicales como: los superóxidos (O_2^-), hidroperóxidos (HO_3^-) y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), que atacan las membranas y producirán un daño, para posteriormente causar la muerte celular. (4, 7)

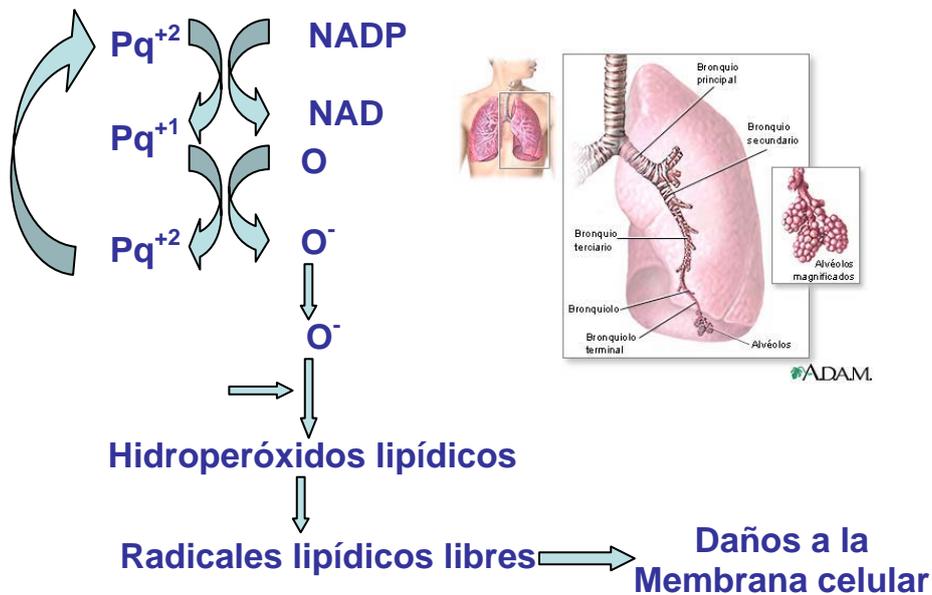


Figura 3. Mecanismo de acción del *Paraquat*

7. MANIFESTACIONES CLINICAS.

La intoxicación por paraquat se manifiesta clínicamente en tres fases, las cuales son:

- Primera Fase: Se observa inflamación, edema y ulceración de las mucosas bucales, faringe, esófago, estómago e intestino (ver figura 4). Pueden presentar vómito, ardor y dolor orofaríngeo, retroesternal, epigástrico y abdominal. Puede haber disfagia, sialorrea, diarrea y hemorragia digestiva. Estas manifestaciones pueden ser inmediatas o presentarse en las primeras 24 horas después de la ingestión. (4,7,8)

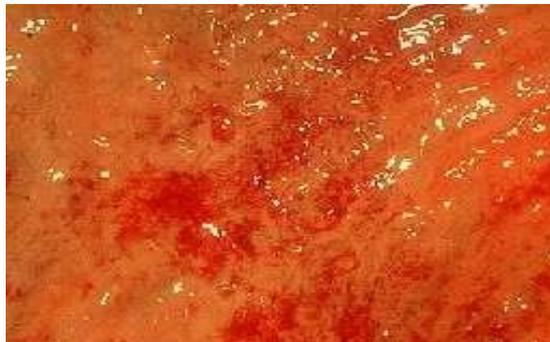


Figura 4. Esofagitis por paraquat

- Segunda Fase: Aparece entre las 24-48 horas. Las principales características son: Daño Hepático, y en los túbulos renales proximales, además del Miocardio y Músculo esquelético. (4,7,8)
- Tercera Fase: Aparecen de 2 a 14 días después de la intoxicación. Se caracteriza por lesión pulmonar. La muerte sobreviene como consecuencia de un severo deterioro del intercambio gaseoso que produce anoxemia y anoxia tisular. (4,7,8)



Figura 5. Fibrosis pulmonar por paraquat

Por encima de los siguientes límites todos los tratamientos ensayados se han revelado ineficaces para alterar el pronóstico de muerte.

Niveles de *Paraquat* en plasma que indican un buen pronóstico del paciente (32):

- ❖ 2 ppm a las 4 h.
- ❖ 0,6 ppm a las 6 h.
- ❖ 0,3 ppm a las 10 h.
- ❖ 0,16 ppm a las 16 h.
- ❖ 0,1 ppm a las 24 h.

En la siguiente figura (6) indican los valores de concentración (mg/L) con respecto al tiempo (horas) en que se ingirió el toxico, hay que destacar que si se encuentra por encima de estos valores ocurrirá una muerte segura. (6)

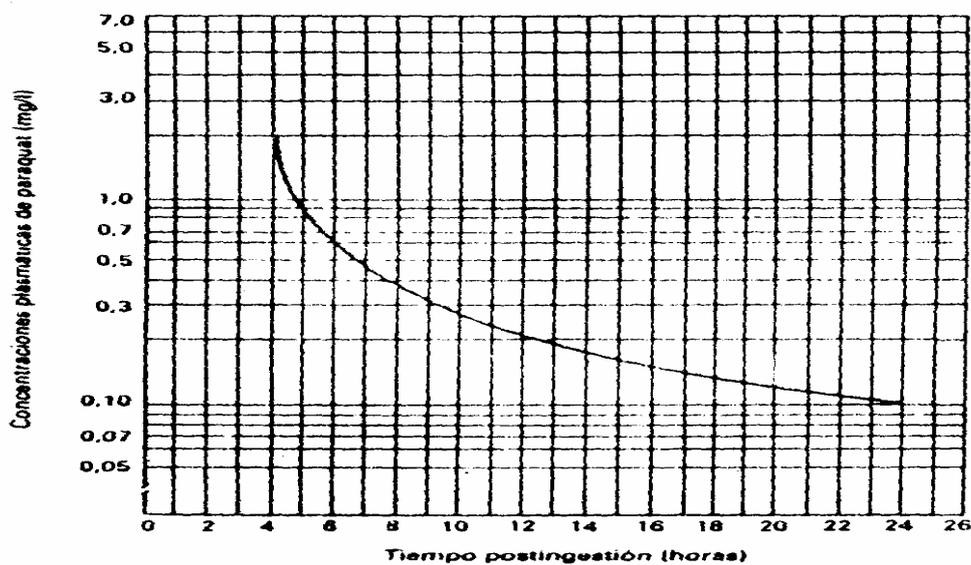


Figura 6. Relación entre la concentración de *Paraquat* en el plasma y la supervivencia del paciente.

8. PROBLEMÁTICA

En todo el mundo se utiliza frecuentemente el *Paraquat* como herbicida (en México ocupa el segundo lugar en ventas), que al ser ingerido en cualquier cantidad y concentración produce toxicidad grave y una alta mortalidad, sin haberse encontrado un tratamiento eficaz para la recuperación de los intoxicados, debido a esto también es utilizado para fines suicidas (6,10).

Se calcula que aproximadamente 8 de cada diez casos son por suicidio, de los cuales un 81.25% son hombres y 18.75% mujeres, con un rango de edad de 15 a 78 años. Los casos por accidentes son de aproximadamente 1.5% y suceden principalmente en niños, el porcentaje restante corresponde a casos de homicidio. (6, 8,10)

En los países en desarrollo o de tercer mundo, los plaguicidas causan aproximadamente un millón de casos de intoxicación llegando hasta 20,000 muertes anuales. (8)

En Estado Unidos de Norte América, el *Paraquat* es usado ampliamente en la agricultura, y en muy diversos productos, como se muestra en la figura 7.

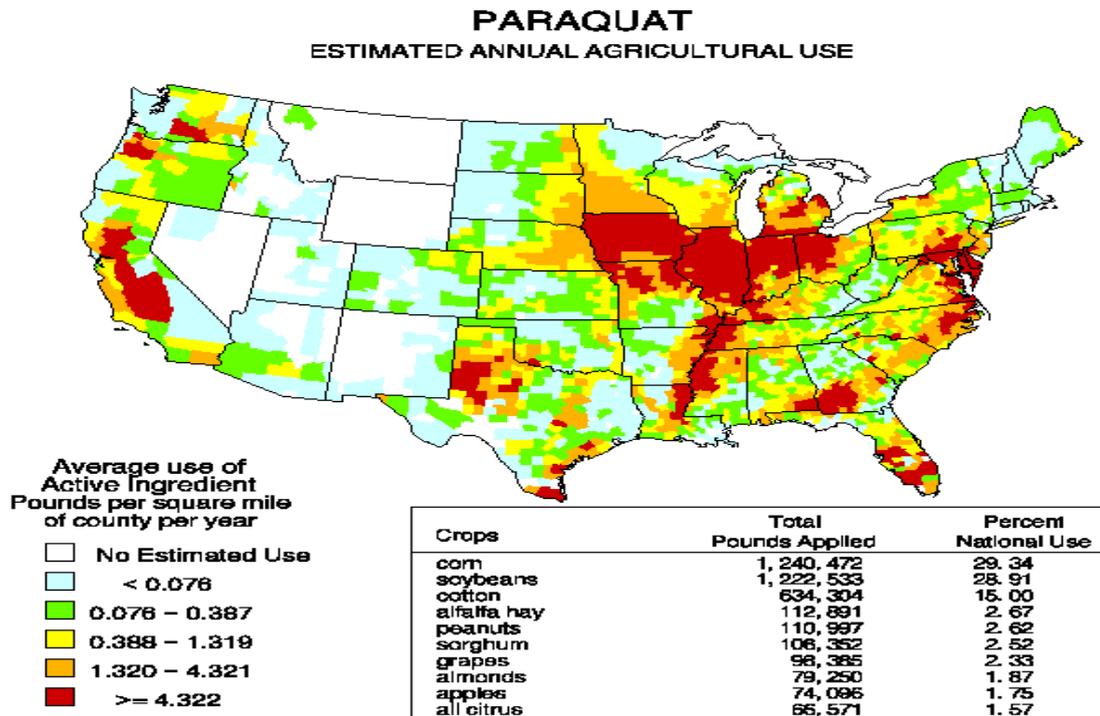


Figura 7. Uso de *Paraquat* en los E. U.

9. METODOLOGÍA

9.1 El problema.

Debido a que el *Paraquat* es altamente tóxico y puede causar la muerte a las pocas horas de haber sido auto-administrado, además de que está demostrado que es comúnmente ingerido, ya sea por accidente (principalmente niños al confundir algún envase) o por suicidio, es necesario contar con un método rápido y efectivo para determinarlo, y así utilizar los medios necesarios para su tratamiento y futura recuperación.

9.2 Hipótesis.

Al finalizar esta investigación se podrá decir cuál es el método más eficaz para determinar el paraquat en personas intoxicadas, y en qué tipo de fluido biológico es más conveniente realizar su estudio.

9.3 Objetivos

1. Describir los fundamentos de las técnicas de identificación.
2. Determinar el método de identificación para el paraquat que sea más rápido y confiable.

9.4 Tipo de estudio.

El tipo de estudio que se realizó es de tipo documental.

10. DESCRIPCIÓN DE TÉCNICAS Y MÉTODOS PARA DETERMINAR PARAQUAT.

Varios métodos han sido reportados para determinar *Paraquat* en diversas matrices como, saliva, orina y plasma sanguíneo, estos métodos pudieran ser colorimétricos, espectrofotométricos, radioinmunoensayo, HPLC.

11. TÉCNICAS Y METODOLOGÍAS

11.1. Prueba del Ditionito de sodio.

Esta prueba se realiza en orina además de ser fácil y rápida de realizar, teniendo su inconveniente en el límite de detección (LD de $0.2\mu\text{g/ml}$), ya que contiene cantidades muy pequeñas, además de que solo es una técnica cualitativa.

Consiste en agregar a 5 cc (centímetros cúbicos) de orina 0.1 g de bicarbonato de sodio para alcalinizar la muestra y 0.1 g de ditionito (hidrosulfito de sodio) recién preparado. Si en la orina hay presencia *Paraquat* iónico, aparecerá casi de inmediato una coloración azul cuya intensidad depende de la concentración del tóxico. Debe realizarse dentro de las primeras 24 horas después de la ingesta. (2,16)

11.2 Método para determinar *Paraquat* en orina utilizando un Espectrofotómetro de UV – Visible

11.2.1. Fundamento del Espectrofotómetro de UV – Visible

El espectro Ultravioleta y Visible de las moléculas está asociado a transiciones electrónicas entre los diferentes niveles energéticos en ciertos grupos o átomos de la molécula y no caracterizan a la molécula como entidad.

Cuando dos átomos forman un enlace químico, los orbitales atómicos de cada uno de ellos se combinan para formar dos orbitales moleculares, uno de baja energía que es el orbital enlazante y otro de energía mayor, que es el orbital antienlazante. Los enlaces covalentes que se originan entre los orbitales de dos átomos que se enlazan químicamente pueden ser de dos tipos y se conocen como enlaces σ y enlaces π .

La absorción de energía radiante en el Ultravioleta o Visible por los electrones n , σ ó π resulta en la excitación de éstos, los cuales pasan a ocupar alguno de los orbitales antienlazantes. La absorción de radiación Ultravioleta o Visible es capaz de efectuar dichas transiciones.

Mientras mayor sea la energía requerida para una determinada transición, menor es la longitud de onda de la radiación que debe suministrarse para conseguir tal fin.

La transición $n \rightarrow \pi^*$ es la que requiere de menor energía y mayor longitud de onda.

La mayoría de las aplicaciones de la espectroscopia de absorción a compuestos orgánicos se basa en transiciones de electrones n ó π al estado excitado π^* ya que las energías que se requieren para estos procesos conducen a picos en una región espectral conveniente experimentalmente (200-700 nm, zona del ultravioleta visible), ambas transiciones requieren la presencia de un grupo funcional que suministre los orbitales π . Hablando estrictamente, es a estos centros absorbentes insaturados a los que se les aplica el término cromóforo.

Existen además los Auxocromos, el cual es un grupo funcional que no absorbe por si solo en la región del ultravioleta pero tiene en efecto de desplazar los picos de los cromóforos hacia longitudes de onda largas, además de aumentar su intensidad.

Se utilizan más frecuentemente los disolventes no polares como los hidrocarburos, ya que estos no afectan las posiciones de los máximos de absorbancia. Entre los disolventes comunes para espectroscopia UV se incluyen el agua, el etanol del 95%, el ciclohexano y el 1,4 dioxano.

Desarrollo del método

Las soluciones estándar se realizaron en una solución saturada de cloruro de amonio para obtener: 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 $\mu\text{g/ml}$ de Ion *Paraquat*.

Se preparo la solución reductora, que contenía 1% de ditionito de sodio en 1N de hidróxido de sodio, y se preparo dentro de las 2 horas previas al tratamiento de las muestras y estándares.

A las muestras y estándares se les agrego 2ml de una solución reductora de ditionito de sodio al 1%.

Se dejaron reposar las muestras por 5 minutos.

La absorbancia fue medida a 369 nm y se utilizaron celdas de cuarzo de 4 cm.

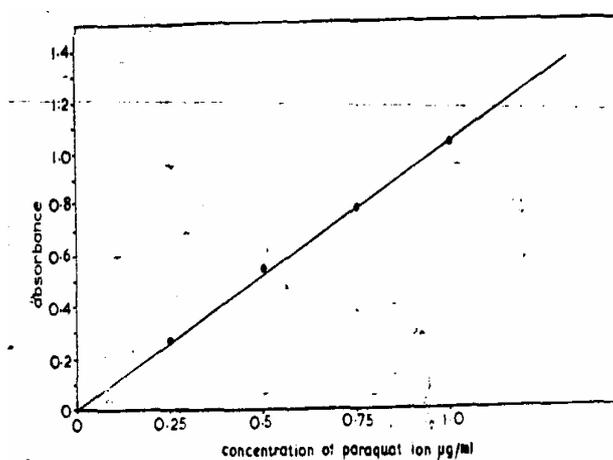


Figura 8. Curva de calibración del *Paraquat*

11.3. Método para determinar *Paraquat* en plasma sanguíneo usando un detector de par de iones.

11.3.1 Fundamento del HPLC

La cromatografía líquida es un método usado primordialmente para la separación de los componentes de una muestra, en el cual estos se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria mientras que la otra es móvil.

La cromatografía se basa en las fuerzas de competitividad de ambas fases, en donde las fuerzas de retención por la parte de la fase estacionaria y las de dilución o elusión por parte de la fase móvil;

Dependen de la estructura molecular, resultando que adquieren magnitudes distintas según se trate de un soluto u otro, de una fase estacionaria u otra de una fase móvil u otra.

Así una mezcla de varias sustancias o solutos depositada en la cabeza de la columna, saldrá al final de la misma de modo que cada componente fluirá antes o después que los otros, diferenciándose de ellos.

Se trata de un proceso de migración diferencial y su consecuencia es la separación cromatográfica. Si se dispone de un detector a la salida de la columna, se obtendrá información relativa a las cantidades de moléculas que salen de la columna frente al tiempo transcurrido desde la inyección.

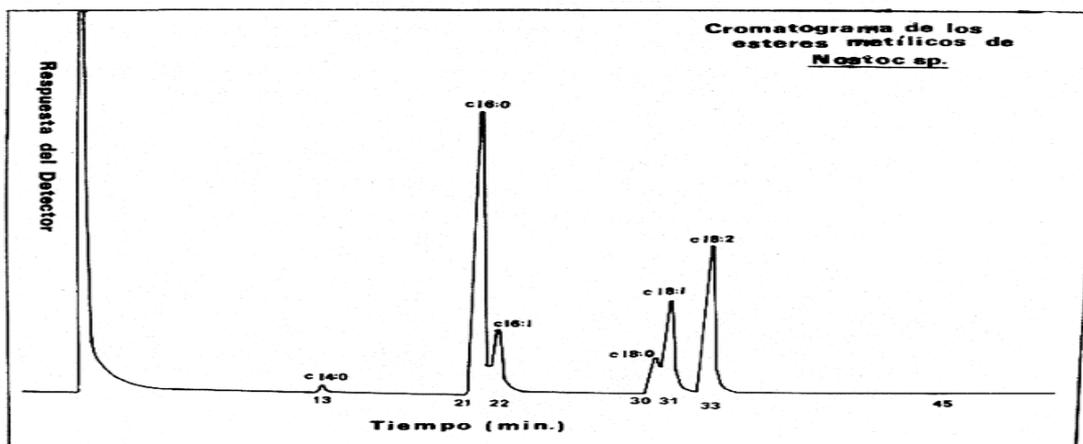


Figura 9. Ejemplo de cromatograma

Desarrollo del método.

En este método se utilizó un estándar interno de "ethyl viologen dibromide". Y todos los reactivos que se usaron fueron grado HPLC.

Hay que indicar que al estándar de paraquat se le dio el mismo tratamiento que a la muestra. (9)

Tratamiento previo de la muestra.

A 1ml de suero se le agregan 10 μ L de una solución acuosa de "ethyl viologen dibromide", y a esto se le adicionó 1ml de acetona.

La solución restante se agitó en un vortex y luego se colocó 5 min en una centrifuga a 2500g. El sobrenadante obtenido se filtró con un tamaño de poro de 0.45 μ m. de aquí tomamos 10ml para introducirlos al equipo HPLC. (9)

Condiciones del equipo HPLC.

Flujo de 1.0ml/min. Para la fase móvil de 0.1% (v/v) de solución acuosa de IPCC-MS3/acetonitrilo en proporción de 92:8

La columna fue Inerstil ODS-3 (4.6mm X150mm, tamaño de partícula de 5 μ m)

La temperatura permaneció constante a 40°C.

Se utilizó un detector de arreglo de diodos (SPD-M10A) a una longitud de onda de UV290nm. (9)

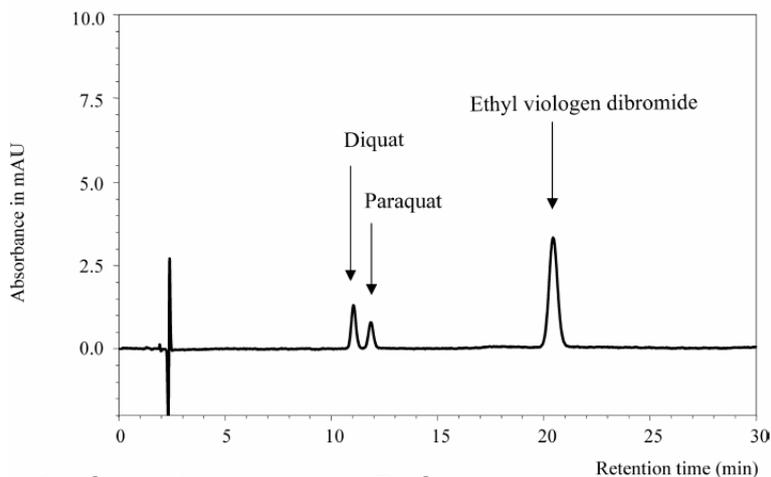


Figura 10. Cromatograma de HPLC para determinar paraquat. (9)

11.4. Determinación de *Paraquat* por Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones (^1H RMN) en orina

11.4.1. Fundamento de (^1H RMN)

La espectroscopia de RMN se puede considerar como la herramienta más poderosa de que se dispone para la determinación de la estructura de los compuestos orgánicos. Como la espectroscopia IR, la de RMN permite hacer uso de muestras en pequeñas cantidades (del orden de 10 mg e incluso cantidades inferiores) sin alterarlas.

El espectro de RMN proporciona una gran cantidad de información acerca de la estructura del compuesto, pudiendo incluso llegar a poder determinar la estructura de moléculas sencillas tan solo con el análisis del espectro de RMN. Sin embargo, en la mayoría de los casos para poder determinar la estructura de una molécula hay que utilizar esta técnica en conjunto con las otras técnicas espectroscópicas y con el análisis químico para poder determinar dicha estructura.

La espectroscopia de RMN se emplea para estudiar una gran variedad de núcleos, entre los que se incluyen el ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F y ^{31}P . Como el carbono y el hidrógeno son los principales componentes de las moléculas orgánicas, para los químicos resultan ser muy útiles. La RMN basa en el protón (^1H) y el isótopo de carbono (^{13}C).

Un núcleo con un número atómico impar o con un número de masa impar tiene un spin nuclear que se puede observar en el espectrómetro de RMN. El núcleo más simple es el protón, y su número atómico impar, es 1, lo cual indica que tiene spin.

Cuando se somete el protón al efecto de un campo magnético externo (H_0) puede suceder que el campo magnético del protón este alineado con el campo magnético externo o bien alineado contra el campo magnético externo.

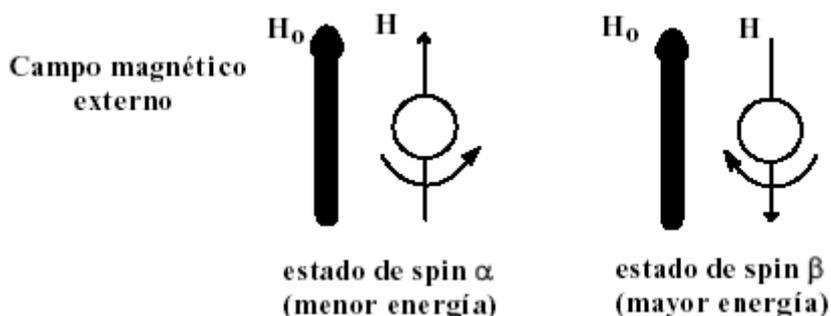


Figura 11. Estados de spin nuclear

Cuando un protón interacciona con un fotón con la energía electromagnética adecuada, el spin del protón puede cambiar de estado pasando del estado α al estado β y viceversa.

Dicho de otra manera un núcleo que tiene su campo alineado con el campo externo absorbe la energía necesaria y cambia de estado. Cuando en un núcleo la combinación de campo magnético y radiación electromagnética es la correcta, se dice que esta en *resonancia* y su energía de absorción se determina en el espectrómetro de RMN.

Desde el punto de vista simple, un espectrómetro de RMN consta fundamentalmente de cuatro partes (ver figura 8):

1. Un potente imán estable y un controlador sensible que nos permite obtener un campo magnético preciso.
2. Un transmisor de radio-frecuencia, capaz de emitir las frecuencias que se requieran.
3. Un detector que nos permita determina la absorción de energía por parte de la muestra.
4. Un registrador que nos representa gráficamente la señal del detector.

Además de estos cuatro también consta de:

5. Un registrador que imprime una gráfica de la absorción (eje Y) como función del campo magnético (eje X). Los valores mayores del campo magnético se sitúan hacia la derecha (campos altos), y los valores menores hacia la izquierda (campos bajos). Los protones más protegidos, como los grupos metilo, absorben a campos altos (parte derecha del espectro), mientras que los protones menos protegidos presentan absorciones que se desplazan hacia campos bajos (parte izquierda del espectro).

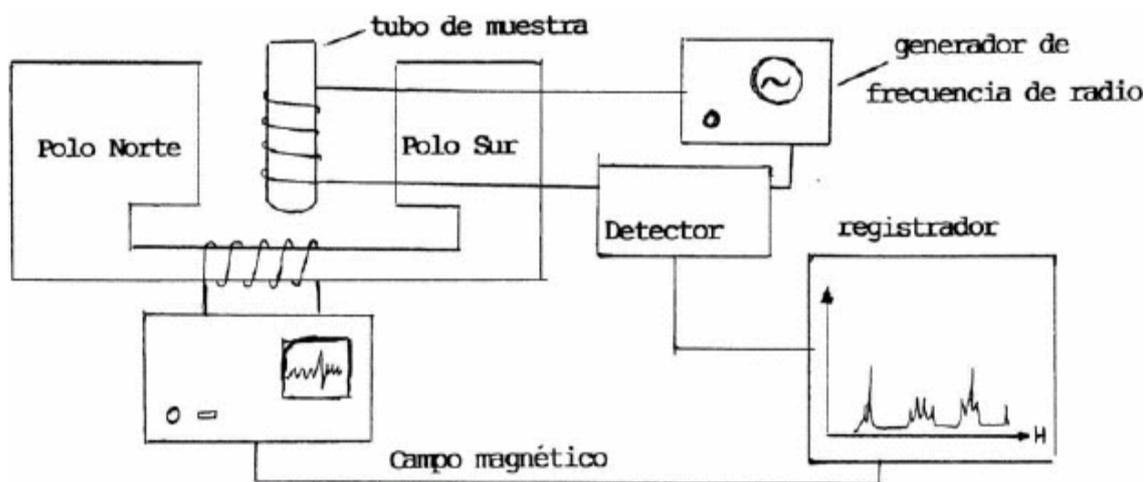


Figura 12. Diagrama de un espectrómetro de ^1H RMN

Desarrollo del método

A un volumen de 0.5ml de orina se le agregaron 50 μ l de $^2\text{H}_2\text{O}$ (deuterada) que contenían sodio-3-trimethylsilyl-(2,2,3,3- $^2\text{H}_4$)-1-propionate (TSP), la concentración final de TSP fue de 0.193mmol/L.

El equipo usado fue un Espectrómetro Bruker AMX400, que operaba con un campo de fuerza de 9.4 Tesla (4000MHz frecuencia de ^1H). Todo se mantuvo a una temperatura de 22° C.

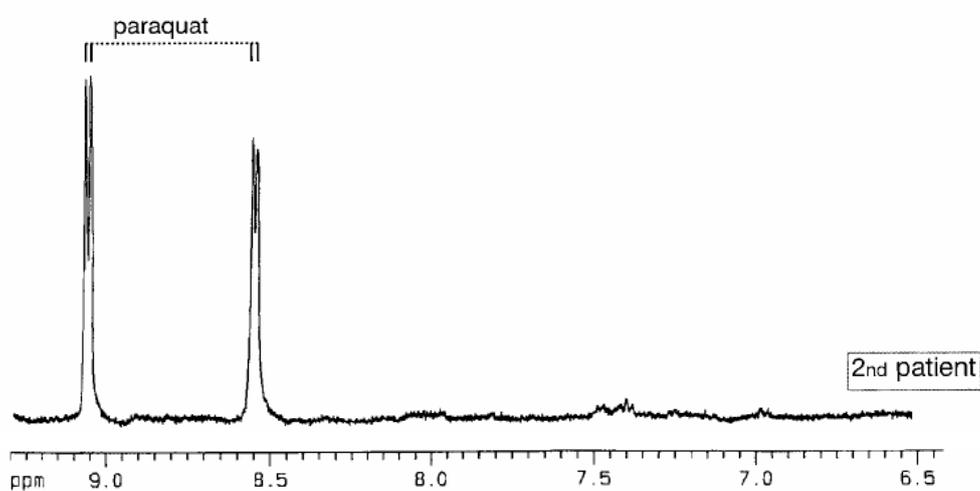


Figura 13. Espectro a 400MHz para determinación de paraquat en orina

12. RESULTADOS

La prueba del Ditionito de sodio es una técnica muy rápida, ya que a la muestra de orina no hace falta realizarle ningún tratamiento previo, también resulta en un bajo costo, la desventaja radica en que la técnica por si misma no nos proporciona una concentración real, además de que no es específica y por ello puede dar falsos positivos, además de tener un límite de detección muy alto, con lo cual no podríamos determinar cantidades muy pequeñas.

Método para determinar *Paraquat* con un Espectrofotómetro de UV – Visible, nos da resultados muy rápidos y tiene la ventaja de que con el se puede obtener la concentración de *Paraquat* en orina, su desventaja radica en que puede ser alterado muy fácilmente por alguna molécula presente en la orina, por lo tanto no es específico, y al igual que la técnica anterior tiene un límite de detección muy alto.

El método para HPLC con detector de par de iones, tiene la principal ventaja de que cuantifica la concentración presente de paraquat en la muestra, además de que (como toda molécula en HPLC) tiene su tiempo de retención específico (12 minutos) para cada técnica específica.

La gran desventaja de este método radica en el tiempo, ya que la elaboración de soluciones, junto con el tiempo de corrida, nos da aproximadamente de 30 minutos (dependiendo del analista), siendo muy lento para determinaciones en casos de emergencia.

El método de Espectroscopia de resonancia magnética nuclear en orina tiene la gran ventaja de que a la muestra no tiene que realizársele tratamiento previo, además de que se pueden ir monitoreando las funciones de los órganos, esto con la misma muestra, solo basta cambiar la longitud de onda y las moléculas principales de cada uno como creatinina, glucosa, citrato, lactato, etc. Y con ello observar si existe un deterioro o una mejoría.

La gran desventaja del método de resonancia magnética nuclear, radica en el equipo, ya que este es excesivamente caro, además de que necesita de condiciones específicas (temperaturas bajas, sitios sin carga magnética y alejados de metales, etc.) además de utilizar disolventes específicos para que no interfieran con la lectura del equipo, todo esto nos produce un costo por mantenimiento muy elevado, por lo cual no resulta muy accesible.

13. CONCLUSIONES

Dado que el *Paraquat* es un herbicida muy usado en todo el mundo y tiene un efecto toxico fulminante, mucha gente lo utiliza como vehiculo suicida, es necesario contar con un método para su determinación rápido y efectivo.

En este trabajo abarcamos diferentes técnicas y métodos para conocer si existen trazas de *Paraquat* o no, en una muestra biológica, además de saber su concentración y con ello intentar salvar una vida mediante un tratamiento mas acertado.

Se analizaron técnicas colorimétricas, de espectroscopia UV-Visible y de resonancia magnética nuclear, HPLC con detector de par de iones.

Todas estas con sus ventajas y desventajas; la mas eficaz para determinar *Paraquat* en muestras biológicas en un caso de urgencia, seria la técnica de espectroscopia de UV – visible, dado que es un método muy rápido y si se cuenta ya con una curva estándar, se podría determinar la concentración fácilmente. Otra ventaja de este método es el costo, ya que tanto el mantenimiento como las soluciones que utiliza no son muy costosos en comparación con otros equipos.

En caso que solo se contara con una muestra sanguínea, la técnica idónea seria por HPLC, ya que esta solo necesitaría 5 minutos en una centrifuga para eliminar las proteínas y se inyecta al equipo.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Bairaktari, E. (1998). Paraquat-induced renal injury studied by ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine. *Clinical Chemistry*. Vol.44 No.6 1256-1261.
2. Benditt, J. O. (2005) Paraquat Poisoning. *Respiratory Care*. Vol. 50 No3. March. 383-385.
3. Bertias, G.K. y colaboradores. (2004). Review of clinical and toxicological features of acute pesticide poisonings in crete (Grece) during the period 1991-2001. *Med Sci. Monit*. Vol.10 No.8. 622-627.
4. Calabuig G. y Antonio J. (1998) *Medicina legal y toxicología*. Masson, S.A. 5ª edición 812 – 817. México.
5. Dreisbach R. H. (1988) *Manual de Toxicología clínica, prevención diagnostico y tratamiento*. El manual moderno 6ª edición 125 – 129 México DF.
6. Duran J.J. (2000). Intoxicación aguda por plaguicidas. *Salud publica mexico*. Vol.42. Enero-Febrero. 53-55
7. Gomez U. y colaboradores. (2004). Impacto en la mortalidad de un tratamiento conjugado, en pacientes intoxicados no ocupacionalmente, con paraquat en el hospital universitario San Vicente de Paúl de Medellín, entre agosto de 2002 y agosto de 2003. *Iatreia* Vol. 17 No 1 marzo. 24- 33
8. Hernandez N. A. y colaboradores. (2000). Intoxicación por paraquat. *Salud en tabasco*, junio, año/vol. 6, numero 001. 302 – 305.
9. Ito M. (2005). Rapid Análisis Method for Paraquat and Diquat in the FERUM Using Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatography. *Biol. Pharm. Bull* 28(4) 725-728.
10. Jeyarathama J. (1990) Acute Pesticide Poisoning: A Major Global Health Problem. *World Health Statistics Quarterly*, Vol. 43, No 3. 139- 144.
11. Knight B. (1999) *Medicina forense de simpson*. El manual moderno. 2ª edición. 125 – 129 México DF
12. Lainez B. y colaboradores. (2000) Estudio prospectivo de intoxicaciones por parquat. *Medicina de Familia (And)* vol.1, No 1, junio 55-58
13. Ministerio de agricultura y Ganaderia. San Jose Costa rica 1991. *Recomendaciones para el manejo seguro de plaguicidas*.

14. Villarias M. J. L. y colaboradores. (1981). Guía de aplicación de herbicidas. Mundi-prensa. 242-248. Madrid España.
15. Ying O. y colaboradores. (2004). A Simple High Performance Liquid Chromatography Method for Analyzing Paraquat in Soil Solution Samples. *J. Environ Qual.* Vol.33, January-February 406-408.
16. López MG, Montoya CMA. (1983) Tratamiento de las intoxicaciones: antídotos y antagonistas. *Bol Med Hosp Infant Mex.*
17. Imbenotte M. Azaroual N. (2003) Identification and quantitation of xenobiotics by ¹H NMR spectroscopy in poisoning cases. *Forensic Sci Int.* Apr 23; 133(1-2):132-5.
18. Paraquat myopathy: report on two suicide cases. *Forensic Sci Int.* 1999 Mar 15; 100(1-2):117-26.
19. Extraction and quantitation of paraquat and diquat from blood. *Forensic Sci Int.* 1993 Dec; 62(3):179-86.
20. Tsung-Li Kuo (1988). Determination of paraquat from formalin-fixed tissue. *Forensic Sci Int.* Sep;38(3-4):243-9
21. Tsung-Li Kuo (1990). Release of tissue paraquat into formalin solution during fixation. *J Forensic Sci.* May; 35(3):668-74.
22. Priti Shivhara and V. K. Gupta. (1991). Spectrophotometric method for the determination of paraquat in water, grain and plant materials. *Analyst.* 1991 Apr; 116(4):391-3.
23. Ramadan A. Abuknesha and Connie Luck (2005) Paraquat enzyme-immunoassays in biological samples: assessment of the effects of hapten-protein Bridge structures on assay sensitivity. *Analyst.* Jun; 130(6):956-63. Apr 25.
24. Spectrofluorimetric determination of paraquat by manual and flow injection methods. *Analyst.* 1998 Jul; 123(7):1577-81.
25. A. J. Cannard and W.J. Criddle (1975). A rapid method for the simultaneous determination of paraquat and diquat in pond and river waters by pyrolysis and gas chromatography. *Analyst.* Dec; 100(1197):848-53.
26. Stewart MJ, Levitt T, Jarvie DR. (1979) Emergency estimations of paraquat in plasma. A comparison of the RIA and ion pair/colorimetric methods. *Clin Chim Acta.* Jun 15; 94(3):253-7.

27. Jarvie DR, Stewart MJ. (1979). The rapid extraction of paraquat from plasma using an ion-pairing technique. Clin Chim Acta. Jun 15; 94(3):241-51.
28. Luis Javier Castro Naranjo y otros. Guías de Manejo de Pacientes Intoxicados. Universidad de Antioquia, turquia 2005 pag. 55
29. Lozano Chavarría L. Marín Ruiz J. y Silva Obando P. "Intoxicaciones por plaguicidas y mordeduras de serpientes" Managua Nicaragua junio 2002 pp 25-39
30. Eddleston M. Sudarshan K. y Senthilkumaran M. Patterns of hospital transfer for self-poisoned patients in rural Sri Lanka: implications for estimating the incidence of self-poisoning in the developing world (2006) Bull World Health Organ vol.84 no.4 Genebra Apr.
31. Reigart R. Roberts M. RECONOCIMIENTO Y MANEJO DE LOS ENVENENAMIENTOS POR PESTICIDAS Quinta Edición, 1999 Washington, DC pp 122. Disponible en formato electrónico en la Internet en: <http://www.epa.gov/pesticides/safety/healthcare>
32. Skoog D. A. Principios de Análisis instrumental 5° ed Ed. McGraw-Hill (1998), págs. 353-367
33. Rafael Vila Candel. Intoxicación por paraquat actuaciones de enfermería <http://www.Enferurg.com>
34. Laynez Bretones F, y colaboradores. Estudio prospectivo de intoxicaciones por paraquat. Hospital de Poniente. En línea: <http://www.samfyc.es/nueva/revista/PDF/numero%201/055-58.pdf>. Consulta: 22 de mayo 2002.
35. Johanny García, y colaboradores. Intoxicación moderada a severa por paraquat tratada con esteroides e inmunosupresores. Datos preliminares. En línea: <http://www.informedonline.com.ve/medicina%>>. Consulta: 22 de mayo de 2002.
36. "Por la prohibición del *Paraquat* en Costa Rica Informe especial para sustentar la demanda de su prohibición en la actividad agrícola". Septiembre 2000.
37. PARAQUAT INFORMATION CENTER. Todos los derechos 2007 reservados por el Centro de Información sobre el Paraquat a nombre de Syngenta Crop Protection AG <http://www.paraquat.com/AboutParaquat/TheScienceofParaquat/tabid/217/Default.aspx>
38. Calderbank and S. H: Yuen. An Ion-exchange Method for Determining Residues en Food Crops. Analyst. February 1965 vol 90. 99-106.

39. Matilde L. Rios A. y Valcarcel M. Sensitive determination of paraquat and diquat at the sub – ng ml⁻¹ level by continuous amperometric flow methods. (1998) *The Analyst*, 123, 2377-2382.
40. Kayoko M. Suzuki O. and Asano M. (1988) Rapid quantitative Analysis of paraquat by electron spin resonance spectroscopy. *Forensic Science International*, 37, 215-222.
41. Perez Ruiz T. Martinez L. Tomas V. and Fenoll J. Spectrofluorimetric determination of paraquat by manual and flow injection methods. *The Analyst* July 1998 vol.123 1577- 1581.
42. Clarke's Isolation and identification of drugs in pharmaceutical body fluids, and post – mortem material 2a edicion London 1986 pp 3-853.