

2 Ej. No. 57



# Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

**MALATION. [Ditiofosfato de O,O-  
dimetil, S - (1, 2 - dicarboetoxilato)  
de etilo]**

## **TRABAJO MONOGRAFICO**

Que para obtener el Título de  
**INGENIERO QUIMICO**  
P r e s e n t a

**FERNANDO LOPEZ VILLAGOMEZ**



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.

## C o n t e n i d o

1.0	Introducción	1
2.0	Generalidades	2
2.1	Propiedades físicas	2
2.2	Propiedades bioquímicas	2
2.3	Obtención	3
2.4	Usos y aplicaciones	5
2.5	Persistencia	6
2.6	Metabolitos	6
2.7	Análisis	8
3.0	Técnicas de análisis	9
3.1	Colorimetría	9
3.2	Cromatografía	18
3.2.1	Cromatografía gas - líquido	21
3.2.2	Cromatografía en capa fina	35
3.3.0	Aplicación de los métodos	39
3.3.1	Método colorimétrico	39
3.3.2	Método cromatográfico gas - líquido	43
3.3.3	Método cromatográfico en capa fina	57
4.0	Tablas, Gráficas, Resultados	61
5.0	Conclusiones	83
6.0	Bibliografía	84

## I.- INTRODUCCION

### 1.0 Introducción

Ante el empleo cada vez mayor de los insecticidas para el control de plagas de una multitud de productos vegetales, se hace necesario el uso de técnicas de análisis que permitan detectar la presencia de tales compuestos que frecuentemente se encuentran presentes en dosis que pueden perjudicar la salud de las personas o animales que los ingieren contaminados.

El objetivo principal de este trabajo es presentar las técnicas para la determinación de residuos de malatión en vegetales de consumo generalizado, y que puedan servir como una referencia concisa con las fuentes de información originales y confiables de los métodos investigados. También se muestran dos métodos por cromatografía gas - líquido para detectar malaoxón ( metabolito del malatión ).

Se hace una revisión de tres métodos: Colorimetría, Cromatografía gas - líquido y Cromatografía en capa fina. Concretamente se muestran los procedimientos incluyendo los reactivos y aparatos de cada una de las técnicas señaladas. Se hace énfasis en el análisis cromatográfico gas - líquido por ser en la actualidad mucho más preciso que los otros dos en la detección de insecticidas fosforados como el malatión. También se presentan los resultados correspondientes, algunas conclusiones y datos complementarios.

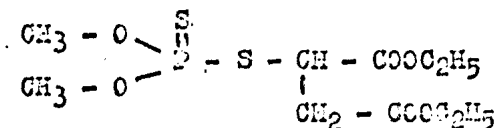
## II.- GENERALIDADES

## 2.0 Generalidades

### 2.1 Propiedades físicas

El malatión también se conoce como compuesto 4049 o como malatón. El nombre químico es Ditiotiofosfato de O,O dimetil, S - ( 1, 2 - dicarboetoxilato ) de etilo. El compuesto puro es un líquido oleoso amarillento, de punto de ebullición entre 156 y 157 °C, sus cristales funden a 7 °C, es casi insoluble en agua ( 145 ppm ) pero soluble en disolvente orgánicos, su presión de vapor a 20 °C es de  $1.25 \times 10^{-4}$  mm Hg., su densidad a 21 °C es de 1.23, su volatilidad es de 2.25 mg./m<sup>3</sup>. El compuesto técnico es un líquido amarillo o café oscuro de punto de ebullición de 157 °C con una pureza del 95 - 98%.

Su fórmula es la siguiente:



### 2.2 Propiedades bioquímicas

La absorción del malatión por el conducto estomacal es rápida, por oxidación se convierte en malaotión, que es la forma activa del compuesto, de esta manera inhibe la colinesterasa *in vivo* o *in vitro* ( 6.2 ).

La administración intraperitoneal u oral del malatión pro -

voca un aumento de la actividad de la transaminasa tirosínica y de la fosfatasa alcalina hepáticas, así como en el descenso del ácido ascórbico suprarrenal, lo cual parece confirmar la hipótesis de que la intoxicación aguda provoca alteraciones metabólicas en las que interviene el sistema hipófiso suprarrenal ( 6.3 ).

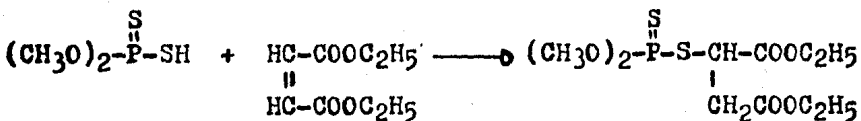
Se han hecho estudios en el hombre ( 6.4 ) y en los animales ( 6.5 ) para medir la toxicidad del malati6n y se han obtenido resultados al respecto.

En el hombre las dosis que no dañan van de 0.0 a 0.02 mg. por cada Kg. de peso de la persona. En la rata las dosis que no le causan daño van de 0.0 a 5 mg. diarios por Kg. de peso del animal.

La tabla 4.1 muestra los datos de toxicidad aguda del malati6n para algunos animales dom6sticos.

### 2.3 Obtenci6n

El malati6n se obtiene mediante la reacci6n entre el Diti6fosfato de 0,0 dimetil y el Fumarato o Maleato de dietilo, como se observa a continuaci6n:





El dietil fumarato es un compuesto en el que el grupo étilo es derivado del etanol. El ácido fumárico puede obtenerse por oxidación de buteno 2 o por oxidación de furfural. El ditiofosfato se prepara haciendo reaccionar el pentasulfuro de fósforo con metanol.

Los datos de la obtención y operación del malatión son los siguientes:

Temperatura.- La reacción se lleva a cabo favorablemente en un rango de 20 - 150 °C.

Presión.- Se recomienda la presión atmosférica.

Medio de reacción.- Se recomienda que la reacción se efectúe en presencia de disolventes como acetona o ésteres alifáticos.

Catalizador.- La reacción puede ser acelerada usando una pequeña cantidad de amina alifática terciaria, como trietil amina o trihexil amina, la cantidad va de 0.2% - 2% respecto al peso total de los reactivos.

Reactor.- Se utiliza un reactor de agitación enchaquetado o de tipo convencional.

Recuperación del producto.- Después de que se enfría, la mezcla se trata con benceno; se lava con carbonato de sodio al 10% y enseguida con agua, la capa

orgánica es luego lavada con sulfato de sodio anhidro, filtrada y concentrada al vacío para obtener finalmente el producto.

#### 2.4 Usos y aplicaciones

El malatión se usa ampliamente para combatir plagas que atacan a una multitud de vegetales.

Su forma de aplicación se hace generalmente de la siguiente manera:

Antes de la recolección.- Principalmente en frutas con hueso como ciruelas, duraznos y aguacates; de pepita como manzanas y peras; pequeñas verduras como zanahorias, tomates y verduras de hoja como la lechuga y la col.

La tabla 4.2 muestra los límites de tolerancia del malatión para diversos productos vegetales en México y en otros países.

Después de la recolección.- Se aplica para proteger una gran variedad de granos durante su almacenamiento, directamente sobre los granos o indirectamente rociando el almacén.

Otros usos.- El malatión se emplea también como parte de mezclas de insecticidas mixtos para combatir diversos insectos domésticos o de importancia sanitaria.

## 2.5 Persistencia

Se sabe que la concentración del malatión en productos vegetales está en relación inversa con el intervalo de tiempo entre el tratamiento químico y la recolección ( 6.15 ), por ejemplo en las coles rizadas, a los tres días de aplicarse este insecticida se encontró que tenía 3.9 ppm de residuos de malatión ( 6.16 ), en las manzanas y en otras frutas como naranjas, toronjas y peras, los residuos desaparecen en un 50% a los dos o tres días de su aplicación ( 6.17 ).

Se considera que con un tratamiento correcto de aplicación del malatión, no haya más de 5 ppm como máximo al cabo de 1.5 días ( 6.18 ).

Se ha comprobado que los residuos de malatión se eliminan rápidamente en las hortalizas y en las frutas frescas, en un 50% a los dos días de su aplicación como máximo ( 6.18 ).

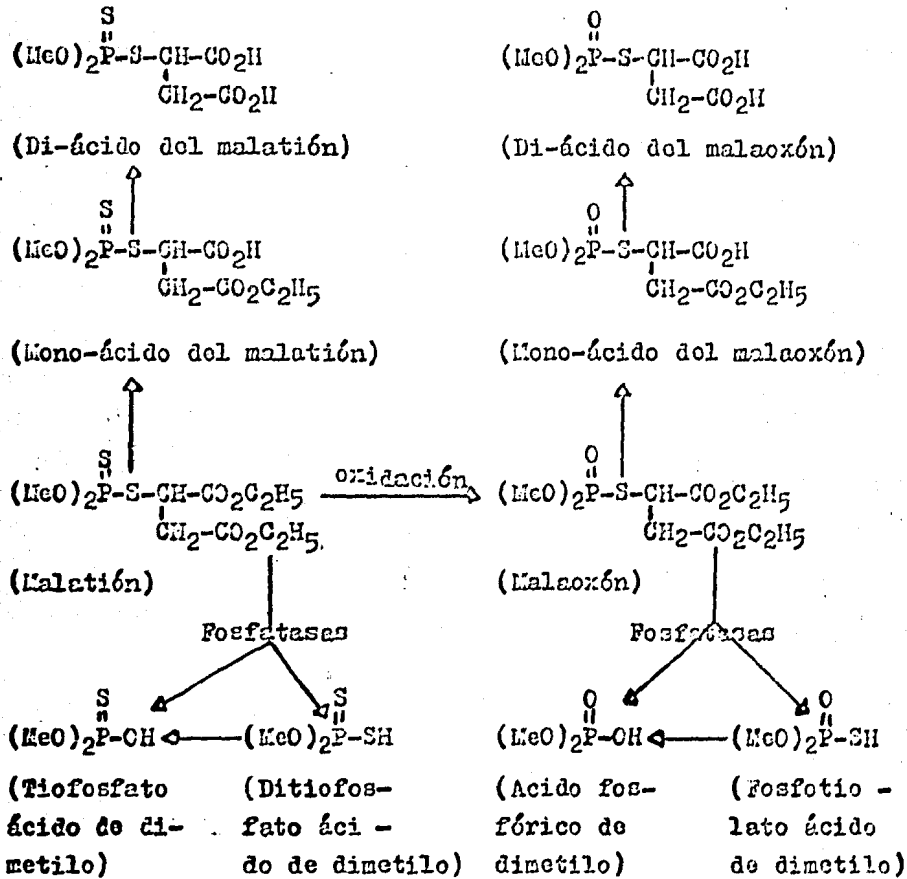
La tabla 4.3 muestra las cantidades de residuos encontrados en frutas y legumbres al tratarse con malatión.

## 2.6 Metabolitos

El número de metabolitos del malatión reportados por varios autores ( 6.19 ) va de 6 a 8, los principales son: El malaoxón, el mono-ácido, el di-ácido y los tiofosfatos ácidos del malatión.

La figura 2.6.1 muestra una secuencia de la ruta posible de la formación de los metabolitos del malati6n en productos y plantas vegetales ( 6.19 ).

Figura 2.6.1



## 2.7 Análisis

El análisis de pesticidas residuales en productos vegetales es un problema difícil de resolver, la principal dificultad es el de poder contar con sistemas muy eficientes para detectar las pequeñas concentraciones en que se encuentran, del orden de  $10^{-4}$  mg. por Kg. de muestra. Los métodos analíticos comunes son imprácticos por las grandes cantidades de muestras que requieren.

Las técnicas de análisis que se han usado son fundamentalmente, la Colorimetría ( 6.6 ), la Cromatografía de gases ( 6.8 ) y la Cromatografía en capa fina ( 6.7 ).

La Cromatografía de gases, específicamente en gas - líquido tiene una amplia aplicación desde 1960 en que Lovelock y Lipsky ( 6.9 ) desarrollaron el detector de captura de electrones que es de gran sensibilidad para sustancias de gran afinidad electrónica como son en su mayoría los insecticidas.

En el siguiente capítulo se describen estas técnicas y sus aplicaciones concretas en la determinación de residuos de malatión en productos vegetales.

Para la detección de malatión se muestran dos métodos.

### III.- TECNICAS DE ANALISIS

### 3.0 Técnicas de análisis

#### 3.1 Colorimetría

En este tipo de análisis el color es la propiedad característica para la identificación de una gran diversidad de sustancias.

Se sabe que cuando un material absorbe luz de determinada longitud de onda manifiesta una coloración específica. En el uso común en la detección de sustancias, se emplean soluciones que absorben y transmiten la luz.

Cuando se absorbe una luz de determinada longitud de onda, la sustancia presentará un color característico que dependerá de la intensidad con que se ha absorbido y de la que se ha transmitido.

La colorimetría está fundamentada en la ley de Beer y en la ley de Lambert.

La ley de Lambert dice que cuando un haz luminoso entra en un medio absorbente perpendicular al plano y paralelo a la superficie, cada capa infinitesimal disminuye la intensidad del haz luminoso que entra en la capa en una fracción constante. El modelo matemático de lo anterior es:

$$\log \frac{I_0}{I} = K_b \dots\dots\dots ( a )$$

Donde:

$K$  = Constante de proporcionalidad

$b$  = Espesor de la capa

$I_0$  = Intensidad de la radiación incidente

$I$  = Intensidad de la radiación transmitida

La ley de Beer dice que la disminución de la energía radiante de un haz de luz monocromática incidente en un medio absorbente, es directamente proporcional a la concentración y a la intensidad de la luz transmitida. El modelo matemático que expresa esta ley es:

$$-\frac{dI_0}{dI} \propto Kc \quad \text{o con logaritmos:}$$

$$\log \frac{I}{I_0} = Kc \dots\dots\dots (b)$$

Tomando como modelo la figura 3.1.1, la deducción de la ley de Lambert - Beer es la siguiente:

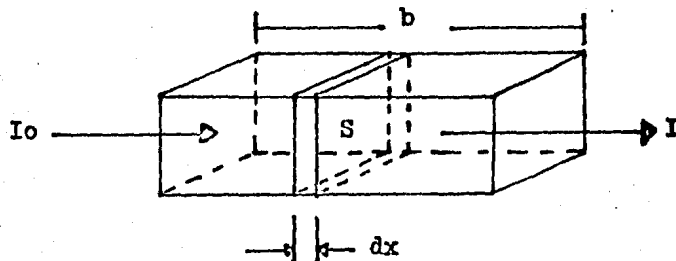


Figura 3.1.1



$I_0$  = Haz de radiación incidente

$I$  = Haz de radiación transmitida

$b$  = Longitud que recorre el haz de luz.

$S$  = Sección transversal

$dx$  = Espesor infinitesimal de la sección transversal

$dn$  = Diferencial de un número  $n$  de partículas

$ds$  = Area de captura de fotones del haz de radiación

$\frac{ds}{s}$  = Probabilidad de captura de un fotón en la sección  $S$

$-\frac{dI_0}{I}$  = Fracción del haz de luz capturado en el medio absorbente. El signo  $-$  indica que  $I$  disminuye.

$$-\frac{dI_0}{I} = \frac{ds}{S} \dots\dots\dots 1$$

$ds = Kdn$  ..... 2  $K$  = constante de proporcionalidad.

Combinando las dos últimas ecuaciones e integrando:

$$-\int_{I_0}^I \frac{dI_0}{I} = \int_0^n \frac{Kdn}{S} \quad \text{o simplemente:} \quad -\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = \int_0^n \frac{K}{S} dn$$

$-\ln \frac{I}{I_0} = \frac{Kn}{S}$ , cambiando a logaritmos base 10, se tiene:

$$\log \frac{I_0}{I} = \frac{Kn}{2.303 S} \dots\dots\dots 3$$

Expresando  $S$  en función del volumen  $V$  y de la longitud  $b$ ,

Se tiene:

$$S = \frac{V}{b} = \frac{C_m^3}{C_m} = C_m^2, \text{ Sustituyendo } S \text{ en la ecuación 3,}$$

se obtiene:

$$\log \frac{I_0}{I} = \frac{K_n}{2.303 \frac{V}{b}} = \frac{K_n b}{2.303 V} \dots\dots\dots 4$$

Expresando  $\frac{n}{b}$  en términos de la concentración  $C$ , se tiene:

$$C = \frac{n \text{ 1000}}{6.023 \times 10^{23} \text{ V}} = \frac{\text{mol}}{\text{litro}}, \quad 1 \text{ C}_m^3 = 1 \text{ ml de solución.}$$

Despejando  $n$  de la ecuación anterior y sustituyendo en la ecuación 4, se obtiene:

$$\log \frac{I_0}{I} = \frac{6.023 \times 10^{23} \times K_b C}{2.303 \times 1000} \dots\dots\dots 5$$

Tomando  $E$  como una sola constante:

$$E = \frac{6.023 \times 10^{23} K}{2.303 \times 1000} \quad \text{y sustituyendo en la ecuación 5,}$$

se obtiene finalmente:

$$\log \frac{I_0}{I} = \frac{E_b C}{I} = A \dots\dots\dots 6$$

Donde :

A = Absorbancia =  $bC$

E = Absortividad molar o coeficiente de extinción molar

C = Concentración, mol/litro

b = Longitud de la trayectoria, Cm

El término  $\frac{I}{I_0}$  es la transmitancia T, que corresponde a

la fracción del poder radiante que incide y que transmite la muestra. La transmitancia se puede dar en porcentaje:  $T \times 100$ , y sustituyendo dicha expresión en la ecuación 6, se tiene:

$$-\log T = EbC = A \quad \dots\dots\dots 7$$

La comprobación de esta ley en una solución se hace graficando la transmitancia contra la concentración o la absorbancia contra la concentración.

Los aparatos utilizados en este tipo de análisis son los fotocolorímetros o simplemente colorímetros, los cuales tienen una celda fotoeléctrica que detecta eficientemente la radiación de la luz monocromática que incida en una sustancia determinada.

Un fotocolorímetro para estas determinaciones tiene básicamente las siguientes partes:

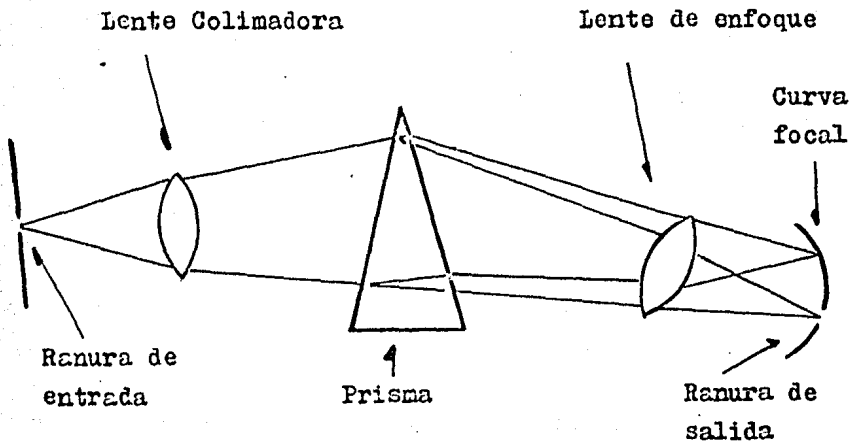
1.- Fuente de energía radiante: Esta fuente dá la luz incidente para la medición; debe ser continua y estable. La forma más usada es una lámpara incandescente con filamento de tungsteno. La estabilidad se controla con la variación del voltaje.

2.- Selector de la longitud de onda: Sirve para reducir la radiación policromática de banda ancha a banda angosta, se conocen comunmente dos tipos de selectores, filtros y monocromadores. Hay dos formas de filtros: los de absorción, que limitan la radiación absorbiendo algunas partes de los espectros; el vidrio coloreado sirve para este propósito, los más baratos y más sencillos son sintéticos. Los filtros de interferencia, que producen bandas estrechas de radiación del orden de 10 nm., dan mayores transmitancias de la longitud de onda que se desee, lo cual no sucede con los filtros de absorción.

Los monocromadores son aparatos que separan la radiación policromática en las longitudes de onda que la forman obteniéndose bandas muy angostas que varían entre 35 y .1 nm. Las partes fundamentales de un monocromador son ( Fig. 3.1.1 ):

- a) Rendija de entrada.- Es la parte por donde entra la radiación policromática de la fuente de luz.
- b) Colimador.- Puede ser lente o espejo.

Figura 3.1.1 Partes fundamen -  
tales de un monocromador de pris -  
ma.



- c) Dispersor.- Puede ser prisma o rejilla.
- d) Lente de enfoque o espejo.
- e) Ranura de salida.

3.- Recipientes para la muestra: Sirven para colocar la muestra problema; se usan celdas o cubetas de vidrio o de cuarzo; las celdas para las soluciones tienen longitudes que van desde 1 a 10 cm., el medio de limpieza es el agua o el ácido nítrico caliente.

La colocación de la celda debe estar perfectamente encuadrada para que el haz de radiación incidente llegue sin problemas de reflexión y de refracción. Cuando se utilizan celdas cilíndricas es recomendable marcarlas para asegurarse de que las mediciones se hacen de la misma forma en determinaciones consecutivas.

4.- Medidor: Es un detector de energía radiante que responde linealmente dentro de los límites del espectro visible. Los fotones del espectro visible tienen la energía suficiente para proyectar los electrones sobre superficies tratadas con determinadas sustancias, de tal manera que se genera una corriente eléctrica que es directamente proporcional al poder radiante de los fotones absorbidos.

Los aparatos utilizados para registrar estas señales eléctricas son las celdas fotovoltaicas y los fototubos.

La celda voltaica consiste básicamente en una capa delgada de óxido cuproso o de selenio colocada sobre una capa de cobre o de hierro respectivamente.

Cuando chocan los rayos de luz, los electrones fluyen del semiconductor hacia el metal cobre o hierro originando una respuesta medible como corriente eléctrica o como fuerza electromotriz.

Los fototubos son mucho más sensibles, pudiéndose lograr un grado mayor de amplificación de la señal. Básicamente están formados por una cubierta de vidrio al vacío, por un cátodo semicilíndrico con una superficie interna recubierta por un compuesto que tenga electrones con una fuerza de unión relativamente pequeña como los óxidos de los metales alcalinos térreos, y un ánodo central de alambre.

Los electrones se recolectan a un voltaje del ánodo de aproximadamente 90 volts respecto al cátodo.

El medio para la transformación de las señales generadas son los fototubos multiplicadores, los amperímetros y los potenciómetros.

En el estudio de la absorción de la luz en la región visible se utilizan los colorímetros fotoeléctricos, los espectrofotómetros y los absorciómetros.

Los modelos básicos de colorímetros fotoeléctricos son:

El de un solo haz y el de doble haz.

Las figuras 3.1.2 y 3.1.3 muestran esquemáticamente los dos tipos.

### 3.2 Cromatografía

Este método de análisis es un sistema de separación física de los componentes de una mezcla, es un método basado en los diferentes coeficientes de partición de las respectivas sustancias involucradas que se distribuyen entre dos fases, una estacionaria y otra móvil o fluida. La cromatografía puede ser de adsorción o de absorción.

En la cromatografía de adsorción, la fase estacionaria es un sólido como la alúmina, gel de sílice u otros; la fase móvil puede ser un gas o un líquido.

La separación tiene lugar cuando uno de los componentes es más intensamente adsorbido que otro por el sólido, lo cual dependerá de la superficie de que se disponga. La separación por adsorción puede ser por Cromatografía en Gas - Sólido. ( C.G.S ), Cromatografía en Columna ( C.C. ) o Cromatografía en Capa Fina ( C.C.F ).



Figura 3.1.2 Colorímetro  
fotoeléctrico de un solo haz

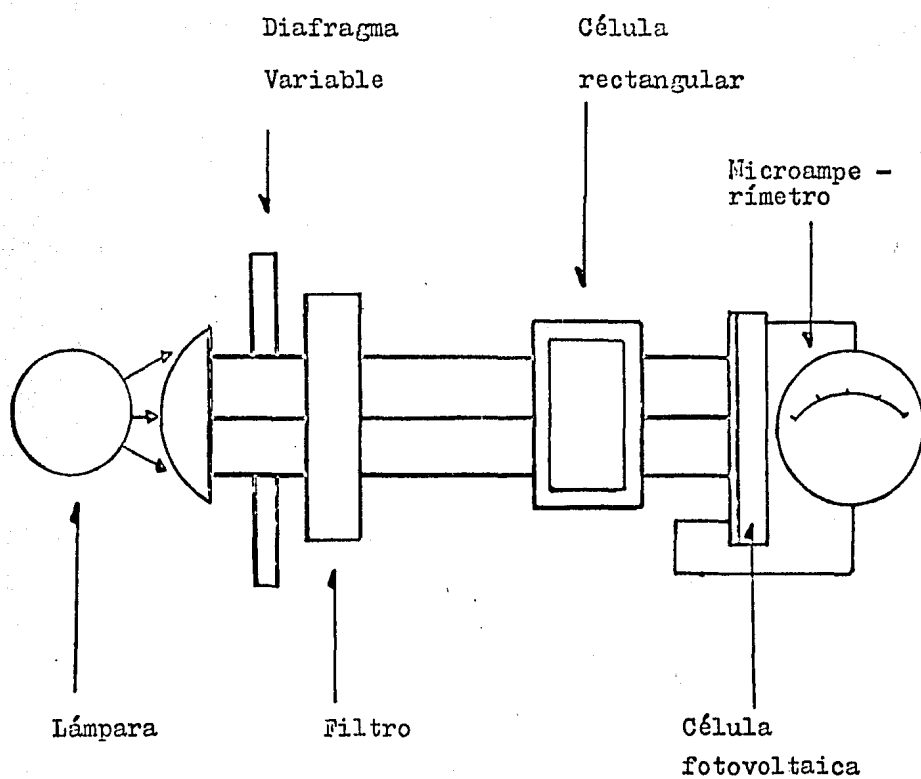
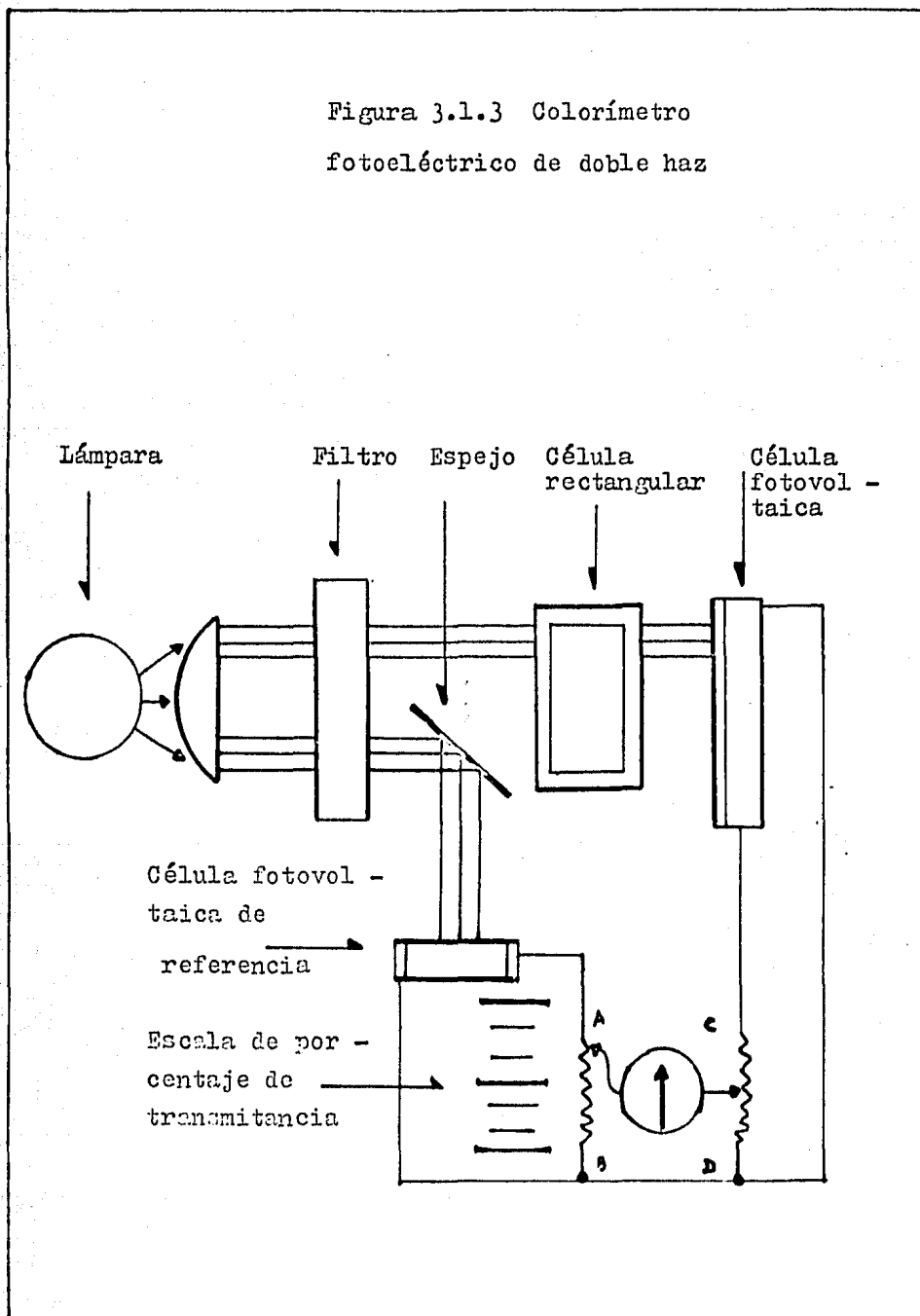


Figura 3.1.3 Colorímetro  
fotoeléctrico de doble haz



En la cromatografía de absorción, la separación de los componentes se debe a la partición ( reparto ) entre la fase móvil y la fase estacionaria; la fase móvil puede ser un gas o un líquido y la estacionaria un líquido, generalmente agua; se requiere también la presencia de un inerte.

Si la distribución es entre un líquido y una gas, se tiene entonces la cromatografía gas líquido ( C.G.L ), si es entre un líquido y un líquido se tiene la cromatografía en columna ( C.C ), en papel ( C.P ) y en capa fina ( C.C.F ).

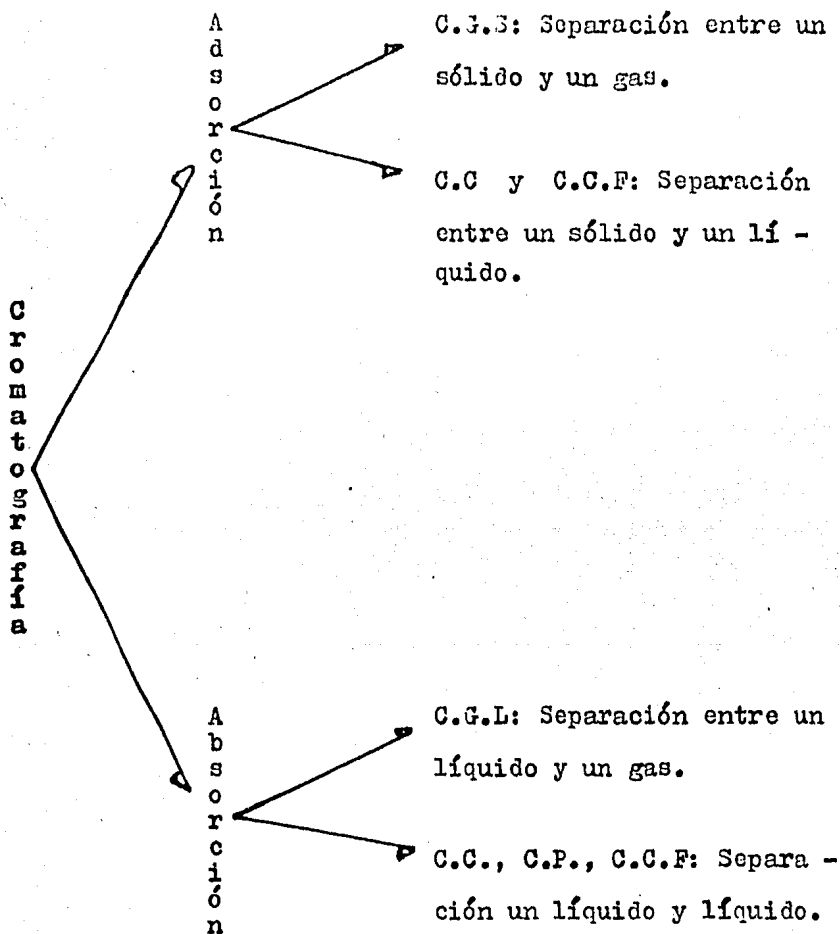
El diagrama 3.2.1 muestra una clasificación general del concepto cromatográfico.

### 3.2.1 Cromatografía gas líquido

Esta técnica sirve primordialmente para separar sustancias volátiles a altas temperaturas en que interactúan con una fase líquida y donde son eluidas por una fase gaseosa. La separación depende del punto de ebullición del compuesto o sustancia problema, de la fuerza y del tiempo de interacción con la fase líquida y de la velocidad del gas portador.

La separación se fundamenta en la diferencia de los coe -

Diagrama 3.2.1 Secuencia conceptual de métodos cromatográficos.



eficientes de partición de los componentes al ser eluidos por un gas inerte como el nitrógeno, el dióxido de carbono, el argón o el helio a través de una columna, ésta contiene un sólido inerte que sirve como soporte al líquido absorbente.

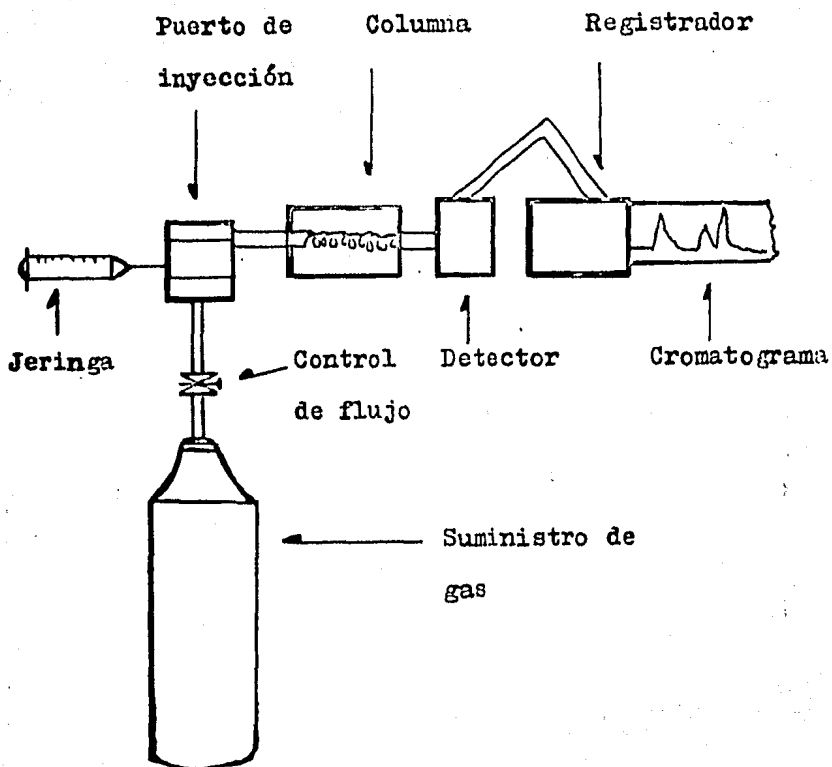
El gas portador lleva la sustancia inyectada en la columna donde los componentes sufren la partición en el líquido de absorción y se separan; al pasar una fracción por el detector seleccionado éste manda una señal al registrador donde es transformada en una gráfica.

El equipo fundamental de un cromatógrafo de gas se ilustra y se describen sus partes a continuación ( Fig. 3.2.2 ):

1.- Suministro de gas: Es una parte o fuente que proporciona gas de manera constante, lo más puro posible; debe ser inerte para evitar la interacción con la muestra o con el solvente. Generalmente se usa hidrógeno, argón, nitrógeno o dióxido de carbono.

2.- Control de flujo: Regula la velocidad de flujo del gas, que es uno de los aspectos importantes que influyen en la eficiencia de la separación; se debe contar con un sistema de control lo más preciso posible, para lo cual se puede utilizar un sistema de válvula con rotámetro, un medidor capilar o un medidor de burbuja.

Figura 3.2.2 Partes fundamentales de un Cromatógrafo de gas.



3.- Introdutor de la muestra: Es la parte por donde se introduce la muestra a la columna cromatográfica; se recomienda que durante la operación no se interrumpa el flujo de gas. La forma más común para introducir la muestra es por medio de inyección con una jeringa hipodérmica de 1 a 10  $\mu$ l a través de una goma sellada. El inyector se acopla a un termostato para regular la temperatura, de tal manera que la muestra se vaporice instantáneamente.

4.- Columna: Es la parte central del sistema donde se lleva a cabo la separación. Es un tubo de dimensiones variables, en forma de "U", recta o en espiral; puede ser de cobre o de vidrio o también de acero inoxidable. La columna está dentro de un horno con termostato y pirómetro para controlar la temperatura.

5.- Detector: Es un dispositivo muy importante que indica la presencia de los componentes de la muestra cuando salen de la columna y la cantidad que hay de cada uno de ellos.

Existen detectores de diversos tipos: de conductividad térmica, de ionización de flama, de helio, de fósforo y de captura de electrones de los más conocidos.

La figura 3.2.3 muestra dos tipos de detectores.

6.- Registrador: Es un aparato que consta de dos partes básicamente, una tira de papel con una determinada velocidad y una plumilla móvil que se activa con la señal eléctrica de un amplificador; de esta manera se obtiene lo que se conoce como cromatograma, el cual marca los picos obtenidos del registro de micro - volts contra tiempo. ( Fig. 3.2.4 ).

El cromatograma proporciona los datos que se requieren para estimar la eficiencia y la resolución de la separación y para hacer el análisis cualitativo y cuantitativos correspondientes.

En un cromatograma se observan los siguientes términos:

( Fig. 3.2.5 )

$O$  = Punto de inyección.- Lugar y momento donde se inyecta la muestra.

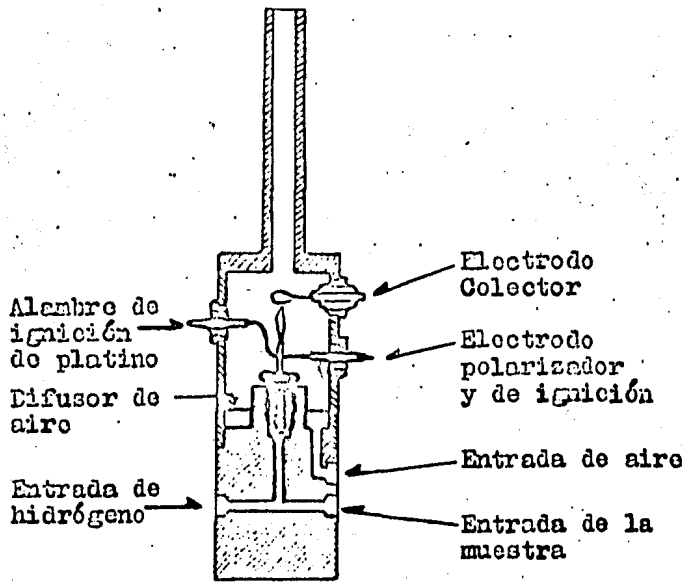
$T_m$  = Pico de aire.- Tiempo que tarda un compuesto que no es retenido por la columna desde el momento de su inyección hasta que se detecta.

$T_r$  = Tiempo de retención.- Tiempo que tarda un compuesto en eluirse en la columna.

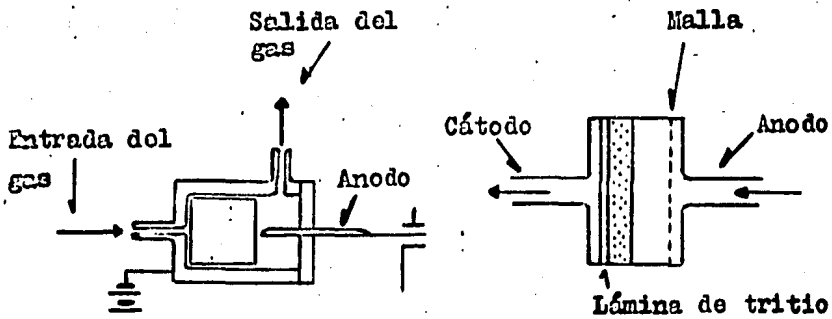


Figura 3.2.3 Esquemas de dos tipos de detectores.

- a) Ionización de flama  
b) Captura de electrones



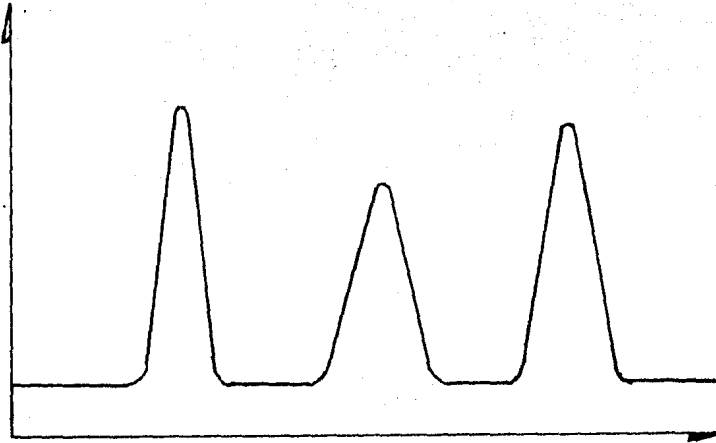
( a )



( b )

Figura 3.2.4 Variables de un  
Cromatograma.

Volts



Tiempo

$T'r$  = Tiempo de corrección corregido:  
Es el tiempo de retención menos  
el tiempo necesario para el pi -  
co de aire.

$W_b$  = Ancho de la base : Es la distancia  
entre las intersecciones de las tan -  
gentes a los puntos de inflexión  
con la línea de la base.

$h$  = Altura del pico: Es la distancia  
perpendicular desde la base ya la  
máxima deflexión del pico.

La eficiencia de la columna ( Fig. 3.2.6 ) y las condicio -  
nes de separación se estiman en forma cualitativa por la  
altura equivalente de un plato teórico, donde el concepto  
es el mismo que se utiliza en los procesos de destilación  
en forma discreta.

La altura equivalente a un plato teórico ( A.E.P.T ) está  
en función de la longitud de la columna y del número de -  
platos teóricos.

Eficiencia de la columna:

$$A.E.P.T = \frac{L}{N}$$

Figura 3.2.5 Partes fundamentales de un cromatograma.

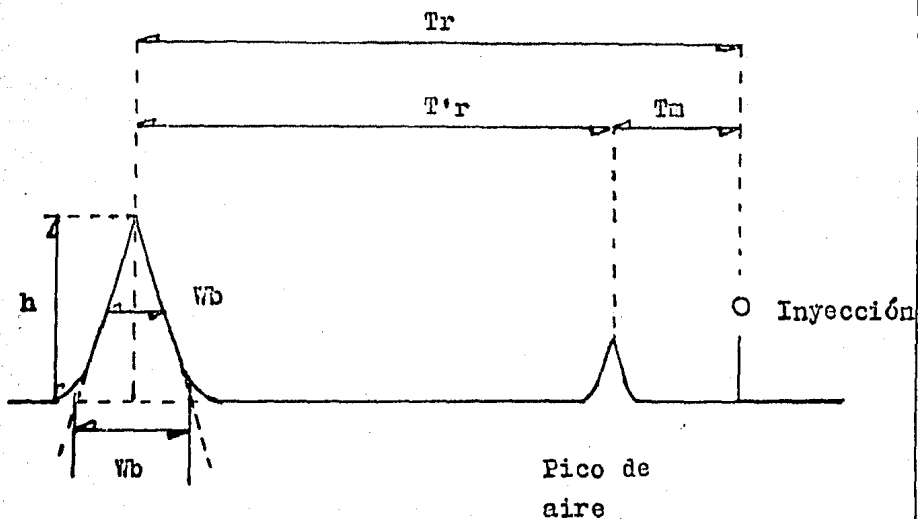
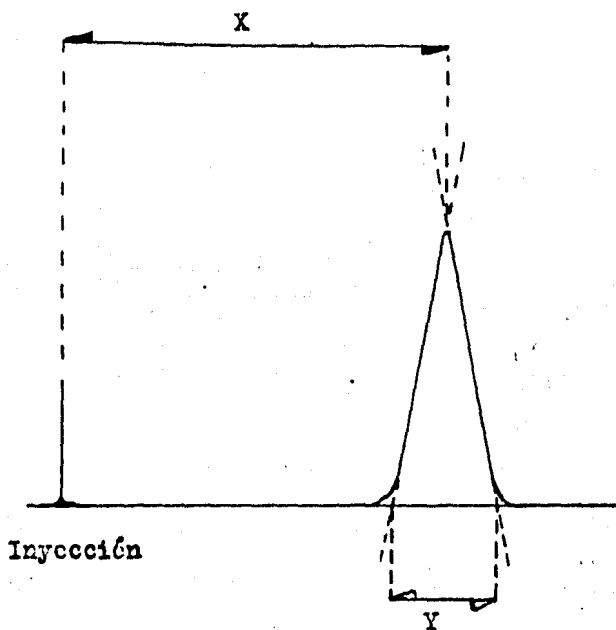


Figura 3.2.6 Eficiencia de la columna cromatográfica.



$L$  = Longitud de la columna

$N$  = número de platos teóricos

$$H = 16 \left( \frac{X}{Y} \right)^2$$

La resolución es una medida de la separación real de dos sustancias que emergen consecutivamente y por lo tanto de todo el sistema. Se consideran los siguientes parámetros ( Fig. 3.2.7 ):

$d$  = Distancia entre los máximos

$W$  = Ancho de la base

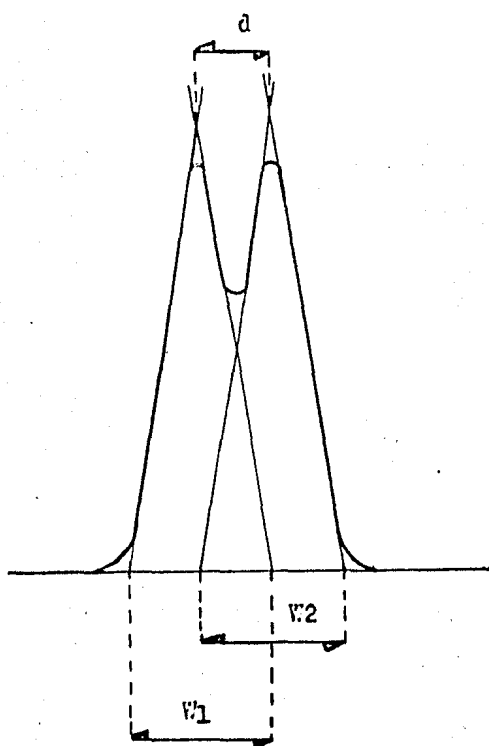
$$R = \frac{2d}{W_1 + W_2} = \text{Resolución}$$

Si  $R = 1$ , la separación es del 98%

Si  $R = 1.5$ , la separación es del 99.7%

**Análisis cualitativo.**- Cuando las condiciones de operación son constantes, el tiempo que tarda un compuesto en eluir - se en la columna es característico de ese compuesto, el cual se obtiene directamente del cromatograma. Frecuente - mente se emplea una variación del anterior, ésto es el concepto y uso del tiempo de retención corregido (  $T'r$  ), que corresponde al tiempo de retención (  $T_r$  ) menos el tiempo

Figura 3.2.7 Resolución de la columna cromatográfica.



que tarda en emerger un compuesto que no se retenga, como el aire o el frente de un disolvente muy volátil; esta forma es aún más precisa si se descarta el tiempo que los componentes permanecen en el volumen muerto de la columna.

Análisis cuantitativo.- El área de cada pico de un cromatograma es proporcional a la cantidad de componente que emerge de la columna, normalmente cantidades iguales de sustancias diferentes no producen la misma respuesta, por lo que es necesario un ajuste o calibración.

Hay varios métodos de calibración, como los factores de respuesta, la calibración absoluta y la calibración indirecta.

Cuando se trabaja con detectores específicos como el de captura de electrones por ejemplo, el método más útil es la calibración indirecta, la cual consiste en preparar mezclas de la sustancia que se va a determinar y de una sustancia como referencia, se recomienda que tenga una estructura similar a la sustancia problema; la mezcla se inyecta al sistema cromatográfico, se utiliza el cromatograma obtenido relacionando las áreas de los picos con las concentraciones de las sustancias empleadas.

Para obtener las áreas de los picos existen varios sistemas: electrónicos, electromecánicos y de triangulación.



para el método de calibración indirecta se tienen las siguientes variables:

$A_s$  = Area de referencia o standard

$A_x$  = Area de la sustancia problema

$C_s$  = Concentración de la sustancia de referencia

$C_x$  = Concentración de la sustancia problema.

Conociendo tres de las cuatro variables, se resuelve para  $C_x$  de la igualdad:

$$\frac{A_s}{C_s} = \frac{A_x}{C_x}$$

### 3.2.2 Cromatografía en capa fina

Esta forma de análisis cromatográfico es una de las más útiles para la separación de una gran variedad de sustancias; se obtienen determinaciones rápidas y bastante completas, requiere de cantidades de muestras mucho menores en comparación con la cromatografía en papel por ejemplo; se pueden lograr determinaciones del orden del 85 al 95%. El material adsorbente, gel de sílice, óxido de aluminio

o celulosa, se extiende uniformemente en forma de capa fina sobre una placa de vidrio o de alúmina.

La muestra problema se aplica con una micropipeta en un extremo de la placa; el punto de aplicación no debe ser mayor de 1 mm; la placa se coloca verticalmente en una cámara de vidrio con el solvente seleccionado.

Los componentes de la muestra se separan independientemente entre sí en función de la adsorción de cada uno de ellos y por la acción del solvente.

En un tiempo razonable de 5 a 30 horas, se saca la placa, se seca y se detectan los componentes del problema.

En este método cromatográfico se utiliza una propiedad muy importante para las determinaciones correspondientes a la separación, esta propiedad es el factor  $R_f$ , que se refiere al movimiento relativo de un compuesto respecto al frente del solvente; es valor reproducible y específico.

En este concepto se utilizan las siguientes variables ( Fig. 3.2.2.1 ):

$a$  = Distancia recorrida por la sustancia A

$x$  = Distancia recorrida por el frente del solvente.

$R_f ( A )$  = Factor de movimiento para la sustancia A.

$$R_f ( A ) = \frac{a}{x}$$

Cuando el frente del solvente excede de las orillas de la placa, se emplea una sustancia ( x ) de referencia tomándose la distancia recorrida por la sustancia problema respecto a esa sustancia ( x ). Para este caso se tiene:

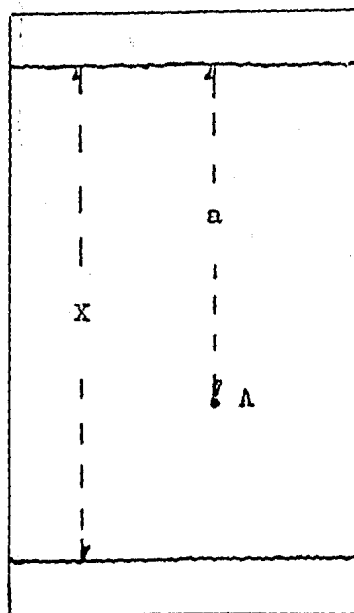
$$R ( X )_A = \frac{a}{x}$$

a = Distancia recorrida por la sustancia A

x = Distancia recorrida por la sustancia de referencia.

$R ( X )_A$  = Factor de movimiento para la sustancia A respecto a la sustancia de referencia.

Figura 3.2.2.1 Variables de un cromatograma en capa fina para un componente.



### 3.3 Aplicación de los métodos

#### 3.3.1 Método colorimétrico

Esta determinación ( 6.6 ) está basada en la rápida descomposición del malatión por un álcali a la sal del ácido dimetil ditiofosfórico y la subsecuente determinación del producto.

Se ha encontrado que el malatión se descompone por la acción de NaOH en dimetil ditiofosfato de sodio y en fumarato de sodio usando como disolvente cloroformo, benceno o tetracloruro de carbono; los mejores resultados han sido con  $\text{CCl}_4$ . Se prepara una curva estándar con dicho disolvente, donde se muestra una absorbancia máxima de 418 m $\mu$  con malatión puro. ( Gráfica 4.1 ).

Se pesan cantidades de malatión y se disuelven en 500 ml de  $\text{CCl}_4$ , se concentra por evaporación hasta 75 ml y se separa como se indica en el procedimiento.

Las soluciones son estables en general a un pH de 4 - 7.

La recuperación de malatión es en general superior al 95%, ( Tabla 4.4 ).

#### Reactivos:

Tetracloruro de carbono, puro.

Alcohol etílico, anhidro.

Acido clorhídrico, 7 N.

Sulfato de cobre,, pentahidratado, Q.P., disolver 1 gr en 100 ml de agua destilada.

Malatión , puro.

Cloruro de sodio, Q.P., disolver 20 gr en 1 litro de agua destilada.

#### Aparatos:

Colorímetro fotoeléctrico. Klet - Summerson, con filtro # 42 y celdas cilíndricas de 1.2 Cm.

Agitador mecánico de 40 rpm.

#### Procedimiento:

Curva estándar.- Se disuelven 0.25 gr. de malatión en alcohol etílico diluyendo a 250 ml, ( 1 ml de EtOH por cada 0.1 mg de malatión ) y se separan partes alícuotas de 2.5, 5, 10, 15 y 25 ml.

Cada parte se lleva a un embudo de separación de 250 ml que contenga 100 ml de  $\text{CCl}_4$ . Se agregan 25 ml de EtOH, 1 ml de NaOH 6 N y se agita vigorosamente durante 1 minuto, inmediatamente después se agregan 75 ml de la solución de NaCl enfriada a 15 °C., se agita durante 1 minuto y se extrae la capa orgánica de  $\text{CCl}_4$  llevándola a un matraz de 100 ml; se agregan otros 25 ml de  $\text{CCl}_4$  extrayendo nuevamente la capa orgánica. Se hace otra extracción con otros 25 ml de  $\text{CCl}_4$  y

1 ml de HCl 7 N agitando previamente durante 1 minuto.

Agregar al matraz de 100 ml con los extractos, 2 ml de sulfato de cobre y 25 ml de  $\text{CCl}_4$ , se agita vigorosamente durante 1 minuto y se mide la absorbancia del complejo formado a 418 m $\mu$ .

La curva estándar se prepara graficando la absorbancia del complejo formado de cada alícuota contra los mg de malatión presentes encada una de ellas. ( gráfica 4.1 ).

Determinación de residuos.- Se coloca en un recipiente, una muestra de 500 - 1000 gramos de producto vegetal y se le agrega  $\text{CCl}_4$ , ( de 1 - 3 ml de  $\text{CCl}_4$  por gr de muestra ) se tapa y se agita durante un tiempo de 5 - 60 minutos.

Extracción.- Se lleva una alícuota del extracto con  $\text{CCl}_4$  a un embudo de separación de 250 ml, diluyendo hasta 100 ml, se agregan 25 ml de alcohol etílico mezclando perfectamente, agregar 1 ml de NaOH 6 N y agitar vigorosamente durante 1 minuto, Extraer la capa orgánica de  $\text{CCl}_4$  y llevarla a un matraz adecuado.

Hacer dos extracciones sucesivas con 25 ml de  $\text{CCl}_4$  agitando vigorosamente cada vez.

La extracción de la capa ácida en los pasos anteriores, elimina los pigmentos formados por la acción del álcali que pudieran interferir en el análisis.

Con una pipeta agregar a los extractos 25 ml de  $\text{CCl}_4$  y 2 ml de sulfato de cobre, agitar vigorosamente durante 1 minuto y medir la absorbancia a 418  $\text{m}\mu$ .

De la curva estándar, se lee la cantidad de malatión correspondiente a la absorbancia medida y se determinan las ppm de malatión en las muestras.

Resultados.- En general se obtienen recuperaciones superiores al 80%, dependiendo del nivel de malatión en las muestras. ( Tabla 4.5 ).



### 3.3.2 Método cromatográfico gas - lí - quido.

En la revisión de los métodos cromatográficos gas - líqui - do para la determinación de pesticidas en general y de ma - lación en particular, se consideran eficientemente aceta - bles en un intervalo práctico de 80 - 100% de recuperación, principalmente los siguientes: El de Abbott et al ( 6.11 ), el de Watts et al modificado ( 6.12 ), el reportado por Ferreira y Fernández para malación y malaoxón ( 6.13 ), el de Storherr y Watts ( 6.14 ) y el de Corley - Beroza para malaoxón ( 6.20 )

Método de Abbott et al.

Reactivos:

Acetona, grado analítico.

Acetonitrilo, grado distol o equivalente.

Cloroformo, grado distol o equivalente.

Sulfato de sodio, anhidro, granular.

Sulfato de sodio, solución acuosa al 2.5%.

Propilén glicol, solución al 50% en acetona.

Malación , puro

Nitrógeno, para gas portador.

Oxígeno, para el detector de la columna cromatográfica.

Hidrógeno, para el detector.

**Aparatos:**

Mezclador.

Embudo de separación, de 1 litro.

Fibra de algodón.

Matraces graduados.

Gránulos contra burbujas.

Embudo para filtrar, de 15 Cm de diámetro.

Microjeringa.

Columna cromatográfica, de 300 x 15 mm.

Evaporador, Kuderna - Danish, con tubo graduado de 10 ml.

Baño de vapor.

Baño de agua.

Cromatógrafo de gas, con registrador y detector para pesticidas fosforados.

**Procedimiento:**

Se pesan 20 gr de la muestra finamente cortada y se llevan al mezclador con 30 gr de sulfato de sodio anhidro, se le agregan 50 ml de acetonitrilo y se mezclan durante 3 minutos, se separa el extracto filtrando en el embudo con fibra de algodón. Enseguida se lleva al embudo de separación que contenga 500 ml de solución de sulfato de sodio al 2.5%, repetir la operación con 50 ml de acetonitrilo y la misma cantidad de sulfato de sodio.

Mezclar el contenido del embudo de separación con 50 ml de cloroformo y eliminar la capa acuosa; llevar la capa de cloroformo a la columna que contenga 10 cm de sulfato de sodio anhidro granulado, repetir la operación 2 veces utilizando 50 ml de cloroformo y 0.1 ml de propilén glicol como conservador y unos granulos contra burbujas.

Reducir el volumen de cloroformo hasta 2 ml mediante baño de vapor y dejar enfriar a la temperatura ambiente, limpiar el evaporador con 3 - 5 ml de acetona y esperar 5 minutos; eliminar cualquier residuo que esté rodeando el tubo evaporador, adaptar la microjeringa y quitar con cuidado el solvente hasta que haya 0.5 ml del mismo en la base del tubo. Poner 0.5 ml de acetona en la microjeringa e inyectarla en el tubo graduado colocándolo en baño de agua a 30 °C venteeando el vapor sobre la zona del extracto hasta que haya un volumen constante, retirar el tubo graduado hasta tener la cantidad que se va a llevar a la columna cromatográfica para su análisis.

Método de Watts, ( modificado ).

Reactivos:

Acetato de etilo, grado reactivo.

Tolueno, grado reactivo.

Acetona, grado reactivo.

Sulfato de sodio, grado reactivo.

Carbón activado. ( 6.11 )

Oxido de magnesio. ( 6.11 )

Colite 545.

Mezcla cromatográfica. 20 gr. de carbón activado, 40 gr. de óxido de magnesio, 80 gr. de colita 545.

Propilén glicol. Redestilado, solución al 50% con acetona.

Malatión puro.

Aparatos:

Mezclador, con medio de enfriamiento.

Columna cromatográfica. 180 x 18 mm. de diámetro interior.

Con capacidad en la parte superior de 150 ml. La parte inferior reducida a 4 - 5 mm. de diámetro.

Fibra de algodón.

Embudo para filtrar. De 100 - 150 mm. de diámetro.

Baño de agua.

Evaporador.

Matraces graduados.

Cromatógrafo de gas. Con registrador y detector para pesticidas fosforados.

Procedimiento:

Se colocan en el mezclador 50 gr de muestra del producto vegetal finamente cortado, junto con 250 ml de acetato de etilo, se le agregan 40 gr de sulfato de sodio anhidro y se agita durante 5 minutos a alta velocidad y 5 minutos a baja velocidad; se filtra el extracto utilizando fibra de algodón, tapar la base de la columna para llenarla bajo succión con 10 gr de la mezcla cromatográfica.

Colocar en la columna, 50 ml de acetato de etilo, acetona y tolueno en la proporción 1 + 1 + 2 y 125 ml del extracto de la muestra ajustando la velocidad de flujo a 5 - 6 ml/min. empleando nitrógeno o aire a succión.

Eluir la columna con 150 ml de acetato de etilo, acetona y tolueno en la proporción antes indicada, agregar 0.1 ml de propilén glicol y concentrar hasta 1 ml utilizando vacío. El volumen requerido para inyectar a la columna cromatográfica se puede ajustar con acetona.

Condiciones para la columna cromatográfica, ( para los dos métodos ):

Columna de vidrio, para la determinación de pesticidas. de 1 - 2 m de longitud, preferentemente de 1 m; de 2 - 4 mm de diámetro interior, preferentemente de 2 mm.

Empacadas con CV - 17, 3 - 5; en malla 60 - 80 Gas - Chrom Q con Epikote 1001 ( 0.02% ) y 1.3% Apiezon lavada en malla

80 - 100 con Chromosorb 3.

La temperatura de la columna: 180 - 200 °C.

Detector: Captura de electrones.

Pasos para la preparación de la columna:

- a) Pesar 0.5 gr. de OV - 17 y 0.002 gr. de Epikote 1001, disolverlos en un vaso de vidrio con 25 ml de cloroformo.
- b) Agregar 10 gr. de Gas Chrom Q malla 80 - 100, mezclar y agitar durante 10 minutos.
- c) Mantener el recipiente en agua caliente a 40 °C, agitar suavemente con una espátula mientras le pasa una corriente de aire o de nitrógeno.
- d) Cuando esté el polvo seco y no haya olor del solvente, taparlo con una hoja de papel limpio durante un día.
- e) Empacar la columna con fibra de vidrio silanizada.
- f) Asegurar la columna sin la conexión para el detector y mantener el flujo de gas portador a 4 ml/min. y la temperatura a 265 °C.
- g) Reducir la temperatura del horno de la columna hasta 210 °C, conectar el detector e inyectar de 5 - 10 µl al empezar el análisis.

Resultados.- En el empleo de los dos métodos, se obtienen recuperaciones superiores al 90% como promedio para distintos

laboratorios que hicieron pruebas con diferentes productos vegetales. ( Tablas 4.6 y 4.7 ).

Método de Ferreira y Fernández, para malati6n y malaox6n.

**Reactivos:**

Acetona, destilada.

Hexano, destilado.

Florisil, malla 60 - 80, a calor durante 2 horas a 300 °C y desactivado con 6% de agua.

**Aparatos:**

Columna cromatogr6fica, 300 x 22 mm de di6metro interior.

Cromat6grafo de gas, Varian Aerograph 2700 con detector termi6nico de sulfato de rubidio, o cromat6grafo de gas

Perkin Elmer F - 17 con detector termi6nico de f6sforo - nitr6geno.

La columna de vidrio se empaca con 2% DC - 200 + 3% QF - 1, 1.5% OV - 17 + 1.95% QF - 1 y 10% CC - 200. Todo en malla 80 - 100 - Chrom. Q. Todo lo anterior para una columna de 1.8 m x 3 mm.

**Cromat6grafo de gas Varian Aerograph:**

Temperatura de inyecci6n: 225 °C.

Temperatura del detector: 235 °C.

Velocidad de flujo del gas portador: 40 ml/min. ( N<sub>2</sub> )

Velocidad de flujo de aire: 120 ml/min.

Velocidad de flujo de hidrógeno: 50 ml/min.

Cromatógrafo Perkin Elmer - 17:

Temperatura de inyección: 250 °C.

Velocidad de gas portador: 40 ml/min. ( N<sub>2</sub> )

Velocidad de flujo de aire: 135 ml/min.

Velocidad de flujo de hidrógeno: 8 ml/min.

#### Procedimiento:

Extracción.- Macerar y mezclar la muestra de producto vegetal, llevar 50 gr. a un recipiente de 500 ml y agitar durante 3 minutos con 80 ml de acetona. Filtrar el extracto por succión con papel whatman # 4, enjuagar la pasta con 2 porciones de 15 ml de acetona; llevar el extracto a un embudo de separación de 1 litro, agregar 250 ml de sulfato de sodio al 2% y extraer con 35 ml de hexano. Completar la separación de las dos capas, la que tiene hexano con un embudo y fibra de algodón colocando unos gránulos de sulfato de sodio anhidro en un matraz de 150 ml; repetir la extracción lavando con otra porción de 35 ml de acetona, llevar este extracto hasta una concentración de 5 ml en un evaporador rotatorio al vacío y a 40 °C.



**Purificación.**- Se prepara la columna cromatográfica con 113 gr. de florisil y con 2 cm de sulfato de sodio anhidro en la parte alta de la columna, se lava con 40 ml de hexano. Llevar el extracto y ajustar a 3 gotas/seg. hasta que alcance el nivel de la capa de sulfato, enjuagar la columna 2 veces con 5 ml de hexano; eluir con 250 ml de acetona y hexano ( 4 + 96 ) y concentrar en evaporador rotatorio al vacío y a 40 °C.

**Resultados.**- Mediante este método las recuperaciones son de 0.1 a 2.0 mg por Kg de muestra con porcentajes superiores al 90% con un límite de sensibilidad menor de 0.1 mg/Kg. para el malatión. ( Tabla 4.8 ).

Para el malaoxón, la recuperación es superior al 87% en las mismas condiciones que para el malatión. ( Tabla 4.9 ).

**Método de Sterherr y Watts.**

**Reactivos:**

Acetato de etilo, redestilado.

Colite 545.

Cloruro de sodio, Q.P.

Malatión, puro.

Solución estándar, 100 ml de malatión / ml.

**Aparatos:**

Mezclador Omni. Servall, Inc.

Adaptador de vacío. Kontes Glass, Co., K - 20500, 24 / 40.

Embudo de separación cilíndrico. Kontes Glass, Co., gradua - do de 250 ml. ( k - 63228 modificado ).

Evaporador. Kudena - Danish, de 500ml.

Tubo de Storch. Kontes Glass, Co., # F - 1423 A.

Fibra de vidrio. Pyrex para filtrar, calentada a 130 °C du - rante 18 horas.

Serpentín de toflón. AWG # 16.

Pirómetro. Rango hasta 250 °C.

Microjeringas. 10, 100 y 250 µl.

Tubos de concentración. Kontes Glass, Co., # K - 57005, 10 E o equivalente.

Tapas de calentamiento. 12 pulgadas de longitud, 0.5 pulga - das de ancho.

Tubo de cobre. 8" de longitud, 0.5" de diámetro interior.

Tapas de asbesto. De 0.5" de ancho.

Cromatógrafo de gas. Barber Colman, modelo 5360, con detec - tor termiónico y columna de recolección de vidrio de 6' x 5 mm. Empacada con Analabs 80 - 90 ABS, contenido de 10% de DC - 200.

**Procedimiento:**

**Extracción.**- Pesar y poner en trozos 20 gr. de producto vegetal en el mezclador agregando 80 ml de acetato de etilo, agitar vigorosamente durante 5 minutos, enseguida poner 10 - 15 gr. de Celite 545; acoplar el aparato de filtración colocando el adaptador de vacío a la boca del embudo de separación cilíndrico con una cinta de hule. Poner un papel filtro blanco de 70 mm # 589 en el " buchner " y filtrar el extracto. Recoger el filtrado en el embudo de separación cilíndrico, quitar el vacío y enjuagar 2 veces con acetato de etilo repitiendo la operación de filtrado.

Agregar al extracto en el embudo de separación, 0.5 gr. de cloruro de sodio y agitar vigorosamente por varios segundos, dejar que se formen las capas durante algunos minutos; drenar el agua, ajustar la capa de acetato de etilo a 125 ml. ( con acetato de etilo ). Filtrar nuevamente en un embudo con fibra de vidrio. Tomar con una pipeta 50 ml ( 10 gr. ) del extracto y llevarlos al evaporador, concentrar con baño de vapor el volumen requerido para la purificación.

**Purificación.**- Concentrar a 5 ml del extracto equivalente a 10 gr. de muestra. Inyectar 4 veces porciones de 250  $\mu$ l de acetato de etilo, ( 250  $\mu$ l por cada 2 gr. de muestra ) consecutivamente cada 3 minutos. Recoger el extracto durante 15

minutos después de la última inyección; desconectar el recolector del tubo de Storherr y retirarlo del baño de hielo. Enjuagar con 250 ml de acetato de etilo y concentrar hasta 5 ml utilizando nitrógeno o aire.

Para determinaciones de residuos a niveles de 0.5 ppm, llevar la concentración a 1 ml. Para niveles menores, llevarla a 0.1 o 0.2 ml.

Resultados.- Los valores de recuperación en los diferentes niveles de prueba van desde un 91% hasta un 110%, y en promedio superiores al 97%. (Tabla 4.10).

Método de Corley - Dorosa, para malaoxón.

**Reactivos:**

Acetato de etilo, destilado.

Acetonitrilo, destilado.

Cloruro de metileno, destilado.

Sulfato de sodio, anhidro.

Isooctano, destilado.

**Aparatos:**

Cromatógrafo Barber Colman, modelo 5220. Equipado con fotómetro de flama.

Mezclador mecánico.

Matraces graduados.

Embudos de separación.

**Procedimiento:**

Cortar y macerar 50 gr de muestra vegetal mezclándola durante 3 minutos con 200 ml de acetonitrilo, enseguida filtrar con papel watman # 12; llevar 100 ml del extracto a un matraz de 1000 ml y concentrar ligeramente con vapor, llevar todo el extracto a un embudo de separación de 250 ml y agregarle 50 ml de acetonitrilo. Hacer 3 extracciones consecutivas con porciones de 50 ml de isooctano cada una, agregar 50 ml de cloruro de metileno, filtrar y tratar la capa inferior con 50 gr de sulfato de sodio anhidro, enjuagar 2 veces con porciones de 25 ml de cloruro de metileno. Tratar el residuo con 15 ml de acetato de etilo y concentrar a 5 ml baño de agua a 50 °C para el análisis cromatográfico.

Las condiciones de operación son:

Columna de Al., de 61 cm x 4 mm de diámetro interior.

Empacada con 2% de succinato de etilén glicol malla 100 - 120 Gas Chrom Q.

Gas portador, nitrógeno a 100 ml / min.

Temperatura de la columna, 160 °C.

Temperatura de inyección de la muestra, 190 °C.

Tiempo de retención para el malaoxón, 9.1 min.

Resultados.- Las recuperaciones que se obtienen por este método para el malaoxón son de un 90% con niveles de prueba de 0.1 a 0.05 ppm. ( Tabla 4.11 ).

### 3.2.2.3 Método cromatográfico en capa fina.

En este procedimiento ( 0.7 ) el malatión es extraído con diclorometano y purificado en cromoplatos con sílica gel con una solución de hexano - acetona 5 : 1 . Después se oxida con persulfato de amonio y se hacen las determinaciones con azul de molibdeno.

Método de Abbot, Thomson y Webb.

Reactivos:

Diclorometano, grado reactivo.

Hexano, grado reactivo.

Acetona, grado reactivo.

Sílica gel, 1. para determinaciones cromatográficas en capa fina.

Sulfato de sodio, anhidro, granular.

Persulfato de sodio, solución 0.25 M.

Solución de urea, 0.25 M.

Molibdato de amonio. Solución al 2.5% en ácido sulfúrico, 10 N.

Acido ascórbico. Solución al 2%.

Fosfato dihidrógeno de potasio.

**Aparatos:**

Equipo para cromatografía en capa fina.

Cromaplatos de 15 x 7.5 cm.

Cámara de vidrio. De 22 x 21 x 9 cm.

Macerador.

Evaporador. Danish - Kuderna.

Tubos de ensayo. Graduados de 10 ml.

Espectrofotómetro. Con celdas de 2 cm.

Baño de agua.

**Procedimiento:**

**Extracción.**- Macerar 50 gr. de producto vegetal finamente picado con 50 ml de diclorometano durante 1 minuto. Decantar el solvente y repetir la operación con 2 porciones de 25 ml de diclorometano. Llevar el extracto al evaporador con columna de 10 x 1 cm, con sulfato de sodio anhidro, lavar el evaporador con 15 ml de diclorometano y evaporar la solución hasta 0.5 ml.

**Purificación.**- Preparar capas de 250  $\mu$  de sílica gel 7 en los platos de 15 x 7.5 cm y activarlos a 120 °C. Aplicar el extracto obtenido en una banda de 3 cm de longitud a 1 cm del borde del plato.



Desarrollar el movimiento con la solución de hexano - acetona hasta que el disolvente alcance el borde superior de la capa; quitar el plato de la cámara y evaporar el solvente. Trazar una línea a lo largo de la banda aplicada, trazar dos líneas a través del plato perpendicularmente a la primera, de manera que queden encerradas las áreas para el cromatograma.

quitar cuidadosamente el adsorbente contenido en el área marcada y llevarlo a un embudo con fibra de algodón. Eluir con 5 porciones de la solución de hexano - acetona ( 3:1 ), recogiendo la solución en los tubos de ensaye, evaporar cuidadosamente en el baño de agua caliente.

Oxidación húmeda y determinación de fósforo.- Se colocan 2 ml de persulfato de amonio al residuo del paso anterior y se calienta en el baño de agua a ebullición durante 10 minutos, enfriar rápidamente y agregar 3 ml de la solución de urea, mezclar y calentar durante 5 minutos, enfriar y agregarle 1 ml de ácido ascórbico, mezclar y calentar durante 1 minuto, enfriar rápidamente; diluir la solución a 7 ml con agua y determinar la densidad óptica a 820 m $\mu$  tomando agua como referencia.

Determinar la cantidad de fósforo mediante la curva estándar.

Curva estándar.- Evaporar varias cantidades de la solución de

fosfato dihidrógeno de potasio en los tubos de ensaye y proceder como en el paso para la oxidación y determinación de fósforo.

El valor de la temperatura del horno es de 120 °C y el valor del Rf en los cromoplatos de 250  $\mu$ m con hexano - acetona 5 : 1 es de 0.33.

**Resultados.-** Se obtienen recuperaciones superiores al 85% con nivel de malatión de 0.2 ppm. ( Tabla 4.E2 )

#### IV.- TABLAS, GRAFICAS, RESULTADOS

## 4.0 Tablas, Gráficas, Resultados.

Tabla 4.1 Toxicidad aguda del malatión  
para algunos animales domésticos.

<u>Animal</u>	<u>Vía de entrada</u>	<u>DL50</u>	
		<u>90% de</u> <u>Puroza</u>	<u>99% de</u> <u>Puroza</u>
Rata macho	Oral	940 - 1156	4700 - 5853
Ratón macho	Oral	720 - 886	3300 - 4060
Pollo	Oral	850 - n.d.	n.d.
Ternera	Oral	80 - n.d.	n.d.
Vaca	Oral	560 - n.d.	n.d.

n.d. = no determinado.

Gráfica 4.1 Curva estándar para malatión.

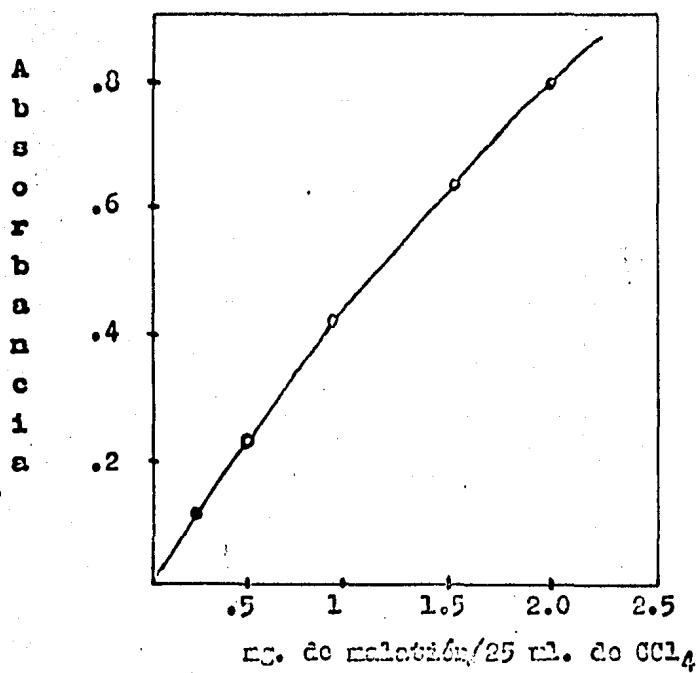


Tabla 4.2 Límites de tolerancia de malatión para diversos productos vegetales en México y en otros países.

<u>Productos</u>	<u>País</u>	<u>Tolerancia ( ppm )</u>
Frutas, verduras y cereales.	México	8
Cereales.	Austria	7
	Brasil	8
	Canadá	8
	E.U.	8
	Francia	8
	Italia	8
	Inglaterra	8
Frutas y verduras.	Bulgaria	5
	Rumanía	5
	Alemania Fed.	5
	Polonia	5
	Checoslovaquia	5
Manzanas, peras, melones, ciruelas y tomates.	E.U.	8
	Canadá	8
Verduras de hoja.	E.U. y Canadá	8

Tabla 4.3 Persistencia del malatión  
entre el tratamiento y la recolección  
de frutas y legumbres.

<u>Producto</u>	<u>Intervalo ( dias )</u>	<u>Residuos ( ppm )</u>
Coles	2	2 a 30
	7	< 0.5
Papas	No se encontraron residuos	
Lechugas	0	21
	7	5
Otras clases de coles	2	3
	7	< 0.5
Habas	0	1 a 50
	3	0.5
Manzanas y peras	0	5
	3	1.5
	7	0.5
Bayas	1	1
	3	0.1

## Continuación de la tabla 4.3

<u>Producto</u>	<u>Intervalo ( días )</u>	<u>Residuos ( ppm )</u>
Remolacha	1	15
	4	9
Cerezas y Ciruelas	0	Hasta 10
	7	1.5
Uvas	1	2
	7	0.5
Melones	0	Hasta 18
	7	3
Tomates	0	Hasta 6
	3 a 4	0.5
Cítricos	1	3.5
	7	1.5
	21	0.5
Cereales ( antes de la recolección )	3	Hasta 4
	7	< 0.5



Tabla 4.4 Recuperación de malatión  
en soluciones de tetracloruro de car -  
bono.

<u>Soluciones de CCl<sub>4</sub> ( ml )</u>	<u>Malatión: Agregado ( mg. )</u>	<u>Encontrado ( mg. )</u>	<u>Recupe - ración (%)</u>
500	0.28	0.25	89
500	0.55	0.55	100
500	0.55	0.55	100
500	0.69	0.69	100
500	0.97	0.93	96
500	1.38	1.43	103
500	1.73	1.73	100
500	2.08	1.98	95

Tabla 4.5 Recuperación de malatión en  
frutas y legumbres por colorimetría.

<u>Vegetal</u>	<u>Muestra</u> ( grs. )	<u>Nivel de malatión,</u> ( ppm )	<u>Recuperación</u> ( ppm )	<u>Recup.</u> ( % )
Manzanas	500	1.0	1.1	110
	500	2.0	2.1	105
	855	0.8	0.8	80
	690	0.8	0.8	80
Espinacas	500	0.5	0.3	60
	500	1.0	0.7	70
	500	2.1	1.5	71
	610	1.0	0.9	90
	628	1.0	0.9	90
Jitomates	1660	0.5	0.4	80
	636	0.5	0.3	60
	925	1.0	0.8	80
Uvas	247	1.0	0.9	90
	504	1.0	0.9	90
Chícharos	711	1.0	0.8	80
	984	1.0	0.8	80
Alfalfa	204	1.0	0.9	90
	210	2.0	1.9	95

Tabla 4.6 Recuperación de malatión de productos vegetales por el método de Abbott et al.

<u>Producto</u>	<u>Laboratorio</u>	<u>Recuperación ( % )</u>
Zanahorias	2	92, 95
	5	88, 79
	6	97, 99
	11	93, 98
	Promedio	93
Manzanas	7	102, 107
	8	98, 100
	10	95, 101, 105
	Promedio	101
Chícharos	1	93, 95
	4	87, 88
	5	89, 87
	9	92, 89
	Promedio	90

NOTA: El número de laboratorio corresponde a la fuente original.

## Continuación de la tabla 4.6

<u>Producto</u>	<u>Laboratorio</u>	<u>Recuperación ( % )</u>
Lechugas	1	74, 76
	2	97, 97
	5	95, 94, 92
	7	99, 98
	10	97, 96, 97
	Promedio	93

NOTA: El número de laboratorio corresponde a la fuente original.

Tabla 4.7 Recuperación de malatión de  
 Productos vegetales por el método de  
 Watts, modificado.

<u>Producto</u>	<u>Laboratorio</u>	Recuperación ( % )
Lechugas	2	77, 79
	4	88, 92, 98, 99
	5	95, 94, 92
	6	90, 92
	7	98, 107
	8	91
	9	95, 101
	10	100, 98, 103
	Promedio	94
Zanahorias	2	100, 102
	5	100, 102
	6	94, 89
	7	111, 105
	10	92, 96
	Promedio	99

## Continuación de la tabla 4.7

<u>Producto</u>	<u>Laboratorio</u>	<u>Recuperación ( % )</u>
Chícharos	1	88, 108
	6	100, 94
	8	98, 79
	10	95, 98
	11	80, 84
	Promedio	92
Manzanas	4	89, 96
	8	96, 93
	10	94, 98
	11	83, 79
	Promedio	90
Jitomates	2	99, 103
	5	96, 98
	6	99, 95
	7	106, 94
	10	92, 84
	Promedio	97

Tabla 4.8 Recuperación de malatión de productos vegetales por el método de Ferreira y Fernández.

<u>Producto</u>	<u>Nivel de prueba ( mg./ Kg. )</u>	<u>Recuperación ( % )</u>
<b>Manzanas</b>	2	98
	1	93
	0.5	95
	0.2	92
<b>Naranjas</b>	2	96
	1	94
	0.5	98
	0.2	90
<b>Melocotones</b>	2	96
	1	99
	0.5	98
	0.2	98

## Continuación de la tabla 4.8

<u>Producto</u>	<u>Nivel de Prueba</u> ( mg. / Kg. )	<u>Recuperación</u> ( % )
Uvas	2	98
	1	97
	0.5	99
	0.2	99
Jitomates	2	95
	1	97
	0.5	96
	0.2	96
Col	2	98
	1	88
	0.5	90
	0.2	87



Tabla 4.9 Recuperación de malaoxón de productos vegetales por el método de Ferreira y Fernández.

<u>Producto</u>	<u>Nivel de prueba ( mg./ Kg. )</u>	<u>Recuperación ( % )</u>
Manzanas	0.2	94
	0.1	93
Naranjas	0.2	91
	0.1	87
Melocotones	0.2	82
	0.1	84
Uvas	0.2	87
	0.1	88
Jitomates	0.2	100
	0.1	95
Col	0.2	92
	0.1	89

Tabla 4.10 Recuperación de malatión de productos vegetales por el método de Storherr y Watts.

<u>Producto</u>	<u>Nivel de prueba ( ppm )</u>	<u>Muestra ( gr )</u>	<u>Recuperación ( % )</u>
Col	1.0	0.5	107
	0.5	2.0	95
	0.1	1.0	104
	"	2.0	94
	0.0	2.0	--
	Promedio		100
Zanahorias	1.0	0.5	95
	"	1.0	102
	"	2.0	101
	0.5	2.0	106
	0.0	2.0	--
	Promedio		100

## Continuación de la tabla 4.10

<u>Producto</u>	<u>Nivel de prueba ( ppm )</u>	<u>Muestra ( gr )</u>	<u>Recupera - ción ( % )</u>
Manzanas	1.0	2.0	106
	0.5	2.0	110
	0.1	2.0	106
	0.0	2.0	-
	Promedio		107
Papas	1.0	2.0	91
	0.5	2.0	100
	0.1	2.0	104
	0.0	2.0	-
	Promedio		98
Papas	1.0	2.0	104
	0.5	2.0	98
	0.1	2.0	104
	0.0	2.0	-
	Promedio		102

Tabla 4.11 Recuperación de malaoxón  
de productos vegetales por el método  
de Corley - Beroza.

<u>Producto</u>	<u>Nivel de prueba</u> ( ppm )	<u>Recuperación</u> ( % )
Espinacas	0.1	90
	0.1	90
	0.2	95
	0.2	95
Jitomates	0.1	90
	0.1	92
	0.05	90
	0.05	90

Tabla 4.12 Recuperación de malatión de productos vegetales por cromatografía en capa fina por el método de Abbot, Thomson y Webb.

<u>Producto</u>	<u>Factor</u>	<u>Nivel inicial</u> <u>( ppm )</u>	<u>Nivel final</u> <u>( ppm )</u>	<u>Recup.</u> <u>( % )</u>
Repollos	10.7	0.19	0.2	90
Chicharos	"	0.19	0.2	87
Papas	"	0.12	0.2	93
Jitomates	"	0.13	0.2	100

Factor de conversión:  $\mu\text{g}$  de fósforo a  $\mu\text{g}$  de malatión.<sup>1</sup>

Tabla 4.13 Tiempos de retención ( Tr )  
y Rf del malatión en cromatografía de  
gas y en capa fina.

<u>Tr</u>			<u>Rf</u>		
<u>Cromatografía de gas</u>			<u>Crom. en capa fina.</u>		
<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>
66	85	75	0.37	0.95	..

1 = 2% Apiezon L y 0.2% Epikote 1001.

2 = 4% S.E. 30 y 0.4% Epikote 1001.

3 = 2% X.E. 60 y 0.2% Epikote 1001.

Los valores de Tr son respecto al Paratión = 100.

Longitud de la columna = 150 cm.

Diámetro interior = 0.3 cm.

Temperatura de la columna = 195 °C.

Los sistemas para Rf son:

1 = Hexano - Acetona ( 5 : 1 )

2 = Cloroformo - Acetona ( 9 : 1 )

3 = Cloroformo - Acido acético ( 9 : 1 )

Los sistemas fueron en capas de 250  $\mu$  de sílica gel G.

Tabla 4.14 Tiempos de retención  $T_r$   
del malatión respecto al paratión ( 100 )  
en diferentes tipos de columnas.

<u>Doxsil 300</u>	<u>OV-101</u>	<u>OV-17</u>	<u>OV-210</u>	<u>OV- 225</u>
0.89	0.98	0.97	0.87	0.92

Doxsil 300 = Policarboxilano.

OV-101 = Dimetil silicón.

OV-17 = Fenil - metil - silicón. 50% de Fenil.

OV-210 = Trifluoro - propil- metil - silicón. 50% de Tri -  
fluoropropil.

OV-225 = Cianopropil - fenil - metil - silicón. 25% de cia -  
propil y 25% de fenil.

Temperatura de la columna = 150 °C.

Tabla 4.15 Sensibilidad y tiempo de retención del malati6n en dos tipos de columnas.

<u>Sensibilidad ( ng )</u>		<u>Tr</u>	
<u>Columna de cobre.</u>	<u>Columna de acero Inox.</u>	<u>Silic6n ( 188°C )</u>	<u>Apiezon ( 188°C )</u>
10	5	47	28

Los tiempos de retenci6n son relativos al Dieldr6n = 100.

Columna de silic6n = 2 pies x  $\frac{5}{32}$  pulg. de di6metro interior.

Empacada con 10% w/w elast6mero de silic6n E - 25, con 2.5% Epikote 1001 en Celita malla 100 - 200.

Columna de Apiezon = 3% w/w Apiezon L o N con 0.3% Epikote 1001.

Se utiliz6 detector de captura de electrones en ambas columnas.

ng = nanogramos.



Tabla 4.16 Valores de Rf del malatión  
en diferentes sistemas eluyentes en ca -  
pa fina.

<u>Sistema</u>		<u>Rf</u>
Eter de petroleo - Acetona	90:10	.34
" " "	75:25	.55
" " "	50:50	.98
Eter de petroleo - Cloroformo	90:10	0.0
" " "	50:50	.22
" " "	10:90	.83
Eter de petrol. - Acet. Etil.	75:25	.73
" " "	50:50	.89
Eter de petrol. - Etanol	97.5:2.5	.30
" " "	95:5	.52
Eter de petrol. - metanol	98:2	.33
" " "	95:5	.64
" " "	90:10	.45
Benceno - Cloroformo	50:50	.35
Benceno - Acet. de Etilo	95:5	.46
" " "	90:10	.70

**V.- CONCLUSIONES**

## 5.0 Conclusiones

- 5.1 Los residuos de los insecticidas en general, y del malatión en particular tienen efectos nocivos en la salud de las personas y de los animales.
- 5.2 El empleo de los insecticidas como agentes de fumigación en productos comestibles debe ser racionalizado y conforme a las normas de seguridad que se recomiendan.
- 5.3 Es necesario contar con métodos de análisis para la determinación de residuos en productos vegetales.
- 5.4 La colorimetría, la cromatografía gas - líquido y en capa fina, son técnicas confiables para esas determinaciones.
- 5.5 Estudiados los resultados de las técnicas anteriores, la Cromatografía en Gas - Líquido es la más eficiente y recomendable para la determinación de residuos de malatión en productos vegetales en general.

**VI.- BIBLIOGRAFIA**

## 6.0 Bibliografía

- 6.1 Manual de Pesticidas Autorizados para 1980.  
S.A.R.H., 1980.
- 6.2 O' Brien., R.D.  
J. Econ. Ent., Vol. # 50, 1957, pag. 159.
- 6.3 Murphy, S.D.  
Toxicol. Appl. Pharmacol.  
Vol. # 8, 1966, pag. 348.
- 6.4 Moeller, H.C.  
Toxicol. Appl. Pharmacol.  
Vol. # 4, 1962, pag. 123.
- 6.5 Rider, J.A.  
Toxicol. Appl. Pharmacol.  
Vol. # 4, 1962, pag. 123.
- 6.6 M.V. Norris, W.A. Vail, and P.R. Averell.  
Agric. and Food Chem.  
Vol. 2, # 11, 1954, pag. 570.
- 6.7 D.C. Abbot.  
Analyst.  
Vol. # 92, march, 1967, pag. 170.
- 6.8 Moye, H. Hanson.  
Analysis of Pesticides Residues.  
New York, 1961.

- 6.9 Lovelock, J.E. and Lipsky, S.R.  
J. Am. Chem. Soc.  
Vol. # 82, 1960, pag. 431.
- 6.10 Hobart, H. Willard. Lynne, L. Merriet, Jr. and  
John, A. Dean.  
Métodos Instrumentales de Análisis.  
1971, Cuarta Ed. C.E.C.S.A.
- 6.11 Abbott et al.  
Report by Panel on Determination of Residues of  
Certain Organophosphorus Pesticides in Fruits and  
Vegetables.  
Analyst. Vol. 102, November, 1977, pag. 861.
- 6.12 Watts et al.  
Analyst.  
Vol. 102, November, 1977, pag. 860.
- 6.13 Ferreira y Fernández.  
J. Ass. Off. Anal. Chem.  
Vol. 63, # 3, 1980, pag. 517.
- 6.14 Storherr y Watts.  
J. Ass. Off. Anal. Chem.  
Vol. 48, # 6, 1965, pag. 1154.
- 6.15 Waites, R.E., and Van Middeltem, C.H.  
J. Econ. Ent.  
Vol. # 51, pag. 306.

- 6.16 Tew, R.P. and Sillibourne, J.M.  
Ann. Report.  
Vol. # 48, 1960, pag. 116.
- 6.17 Tomizawa, G. and Sato, T.  
Scientific Insect Control.  
Vol. # 25, 1960, pag. 99.
- 6.18 Koivistoinen, P., Karimpa, M.K. and Roine, P.  
J. Agric. Food. Chem.  
Vol. 12. # 6, 1964, pag. 557.
- 6.19 Rowlands, D.G.  
J. Sci. Food. Agric.  
Vol. 15, December, 1964, pag. 826.
- 6.20 Analytical Methods for Pesticides and Plant Growth  
Regulators.  
Ed. Gunter Zweig.  
Vol. III, V y VI.
- 6.21 Métodos Instrumentales de Análisis.  
Robert, L. Pecsok., y L. Donald, Shields.  
Ed. Limusa, 1973, México.
- 6.22 Instrumentación Química.  
Howard, H. Strobel.  
Ed. Limusa, 1974, México.
- 6.23 Pedro Joseph Nathan.  
Separaciones Cromatográficas.  
Dpto. de Quim. del Centro de Invest. de Est. Av. I.P.N.  
1975., ANUIES.

- 6.24 Louis, J. Carson.  
J. Ass. Off. Anal. Chem.  
Vol. 64, # 3, 1981, pag. 714.
- 6.25 Ali El Refai, and T.L. Hopkins.  
J. Ass. Off. Anal. Chem.  
Vol. 55, # 3, 1972, pag. 526.
- 6.26 D.J. Sissons and G.M. Telling.  
J. Chromatog.  
Vol. 47, 1970, pag. 328.
- 6.27 P.J. Bunyan.  
Analyst.  
Vol. 89, Sept., 1964, pag. 614.
- 6.28 J.A.R Bates.  
Analyst.  
Vol. 90, August, 1965, pag. 453.
- 6.29 H.A. McLeod, C. Mendoza, P. Wales and W.P. McKinley.  
J. Ass. Off. Anal. Chem.  
Vol. 50, # 6, 1967, pag. 1216.
- 6.30 Boyd L. Samuel.  
J. Agric. Off. Anal. Chem.  
Vol. 49, # 2, 1966, pag. 346.
- 6.31 Herman Beckman and Dennis Garber.  
J. Ass. Off. Anal. Chem.  
Vol. 52, # 2, 1969, pag. 286.



- 6.32 Calvin Corley and Morton Beroza.  
 J. Agric. Food Chem.  
 Vol. 16, # 2, March - April, 1968, pag. 361.
- 6.33 Marshall Sittig.  
 Pesticide Production Process.  
 Moyes Development Corp., 1967, pag. 36.
- 6.34 N.T. Crosby and E.Q. Laws.  
 Analyst.  
 Vol. 89, May, 1964, pag. 319.
- 6.35 H. Egan, E.W. Hammond and J. Thomson.  
 Analyst.  
 Vol. 89, March, 1964, pag. 175.
- 6.36 Charles W. Stanley and John I. Morrison.  
 J. Chromatog.  
 Vol. 40, 1969, pag. 289.
- 6.37 Richard C. Nelson.  
 J. Ass. Off. Anal. Chem.  
 Vol. 49, # 4, 1966, pag. 763.
- 6.38 Richard C. Nelson.  
 J. Ass. Off. Anal. Chem.  
 Vol. 50, # 4, 1967, pag. 922.
- 6.39 Richard C. Nelson.  
 J. Ass. Off. Anal. Chem.  
 Vol. 48, # 4, 1965, pag. 752.

- 6.40 Crossley, J.  
Chemical Ind. ( London )  
1966, pag. 1969.
- 6.41 Wessel, J. R.  
J. Ass. Offic. Anal. Chem.  
Vol. # 50, 1967, pag. 431.
- 6.42 A.F. Machin, M.P. Quick, and D.F. Waddel.  
Analyst.  
Vol. # 98, 1973, pag. 176.
- 6.43 W. Crisp and K.R. Tarrant.  
Analyst.  
Vol. # 96, 1971, pag. 310.
- 6.44 J.D. MacNeil, R.W. Frei, S. Safe and O. Hutzinger.  
J. Ass. Offic. Anal. Chem.  
Vol. # 55, 1972, pag. 1270.
- 6.45 J.D. MacNeil, M. Hikichi, and F.L. Banham.  
J. Agric. Food Chem.  
Vol. # 23, 1975, pag. 758.
- 6.46 M.C. Kleinschmidt.  
J. Agric. Food Chem.  
Vol. # 19, 1971, pag. 1196.
- 6.47 J.S. Thornton and C.A. Anderson.  
J. Agric. Food Chem.  
Vol. # 17, 1968, pag. 895.

- 6.48 J.B. McBain, I.J. Hoffman, and J.J. Menn.  
J. Agric. Food Chem.  
Vol. # 18, 1970, pag. 1189.
- 6.49 M.C. Bowman, C.L. Holder, and L.G. Rushing.  
J. Agric. Food Chem.  
Vol. # 26, 1978, pag. 35.
- 6.50 E. Mollhoff.  
Pestic. Sci.  
Vol. # 2, 1971, pag. 179.
- 6.51 M.C. Ivey, R.A. Hoffman, and H.V. Claborn.  
J. Econ. Entomol.  
Vol. # 61, 1968, pag. 1647.
- 6.52 D. Gegiou.  
Anal. Chem.  
Vol. # 46, 1974, pag. 742.
- 6.53 G.H. Cook and J.C. Moore.  
J. Agric. Food Chem.  
Vol. # 24, 1976, pag. 631.
- 6.54 S.J. Yu and F.O. Morrison.  
J. Econ. Entomol.  
Vol. # 62, 1969, pag. 1296.
- 6.55 J.R. Pardue.  
J. Ass. Offic. Anal. Chem.  
Vol. # 54, 1971, pag. 359.

- 6.56 D.L. Stalling, R.C. Tindle, and J.L. Johnson.  
J. Ass. Offic. Anal. Chem.  
Vol. # 55, 1972, pag. 28.
- 6.57 J.D. Mac Neil and R.W. Frei.  
J. Chromatog. Sci.  
Vol # 13, 1975, pag. 279.
- 6.58 C.E. Mendoza and J.B. Shields.  
J. Ass. Offic. Anal. Chem.  
Vol. # 54, 1971, pag. 508.
- 6.59 M. Beroza, K.R. Hill, and K.H. Morris.  
Anal. Chem.  
Vol. # 42, 1968, pag. 1611.
- 6.60 H.A. Moye.  
J. Chromatog. Sci.  
Vol # 13, 1975, pag. 268.
- 6.61 J.G. Koen, J.F.K. Huber, H. Poppe, and G. den Boef.  
J. Chromatog. Sci.  
Vol. # 8, 1970, pag. 192.
- 6.62 F.W. Willmott and R.J. Dolphin.  
J. Chromatog. Sci.  
Vol. # 12, 1974, pag. 695.
- 6.63 C.R. Turner.  
Analyst.  
Vol. # 99, 1974, pag. 431.