



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Desarrollo de un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión para la cuantificación del plaguicida Clorpirifos en muestras de agua provenientes de baños de inmersión para ganado.

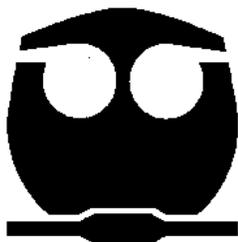
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Q U Í M I C O F A R M A C E U T I C O B I Ó L O G O

P R E S E N T A

José Leopoldo Parada Cisneros



México D. F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Jurado asignado:

PROFESORES

Presidente	Patricia Elizalde Galván
Vocal	Francisco Rojo Callejas
Secretario	Elba Rojas Escudero
1er. Suplente	Maria de Lourdes Mayet Cruz
2do. Suplente	Carlos Damian Zea

El tema se desarrolló en el área de Posgrado de Química Orgánica Lab. 224, Ed. B Facultad de Química, UNAM.

FIRMA

Asesor del Tema	Elba Rojas Escudero
-----------------	---------------------

Sustentante	José Leopoldo Parada Cisneros
-------------	-------------------------------

DEDICATORIAS

Doy gracias a Dios que me permitió concluir mi carrera, la cual he terminado a la fe que siempre tengo en él.

Quiero agradecer a mi familia por el gran apoyo que siempre me brindaron en los momentos más difíciles de mi carrera en especial a mi esposa Loreinne por su motivación, comprensión e interés en mi trabajo, a demás de darme dos hijos maravillosos. A mi madre Ma. Del Carmen Cisneros Acero por su dedicación, sacrificio, comprensión y amor que siempre me brinda, a la que debo todo lo que soy ahora dentro del ámbito profesional y en mi nueva faceta como padre. A mi tía Guadalupe Cisneros Acero, Roberto Rosas Espejel y mi suegra Rosa Isela Salvador Moreno por brindarme su apoyo, comprensión y ser grandes personas. Por último, espero que esta faceta de mi vida, sirva de ejemplo y motivación a mis hermanos: Moisés Eduardo, Reyna Maribel, Israel Rogelio, Ezequiel Emmanuel y Noe Vladimir para que concluyan sus metas trazadas en sus vidas.

A mis amigos de la Universidad que siempre estuvieron conmigo.

A mis amigos de toda la vida. La Familia Rojas Flores en especial a Jorge Rojas Flores, Ivan Antonio Dorado, José Manuel Bocanegra Lizarraga y M^a del Socorro Calvo Maldonado.

Abigail Guadalupe Flores Escartín, Lisset Orgaz Pérez, Larissa Barbosa Sánchez y Tito Alejandro. Por ser amigos muy especiales, cada uno con su forma de ser, me brindan su cariño, apoyo y comprensión, aun más importante su amistad con la que siempre cuento.

A las personas que ya no estuvieron para ver me terminar mi carrera:

Mi padre: José Leopoldo Parada Domínguez.

Mi abuelita: M^a Soledad Acero.

Mi tía: Lidia Elvira Parada Domínguez.

Ma. Joaquina Sánchez de la O.

Gracias a todos

Mi lema es: Con hechos y no con palabras.

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento a la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO por haberme abierto sus puertas y permitirme formar parte de su historia. A la FACULTAD DE QUÍMICA que fue como mi segunda casa, donde me forme como profesional, por lo que nunca la olvidare.

M. C. Elba Rojas Escudero

Me siento muy agradecido por haber sido parte fundamental en el desarrollo y conclusión de este trabajo, además de compartir sus conocimientos y de ser una gran persona en el ámbito académico y en toda la expresión de la palabra, pero sobretodo por su apoyo incondicional que siempre me brindo. Gracias

M. C. Patricia Elizalde Galvan

Gracias por su amistad, su apoyo, sus consejos y lo más importante por su calidez humana que la caracteriza.

M. C. Francisco Rojo Callejas

Gracias por brindarme su amistad y colaborar en mi formación profesional, ya que a parte de ser un buen maestro, es un usted un gran ser humano.

M. C. Georgina Duarte Lisci

Q. F. B. M^a del Socorro Alpizar Ramos

Q. F. B. Angélica Norma Castellanos Chavéz

Q. Juan José Mendoza Flores

Dra. Ofelia Espejo

Gracias a todos por compartir conmigo su experiencia y conocimientos en los distintos ámbitos de la carrera, cada uno con su propia personalidad influyo en mi formación profesional, pero lo más importante de todo esto es la amistad con la que siempre he contado desde el principio. Por lo que me siento agradecido.

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	i
<i>CAPÍTULO 1 GENERALIDADES</i>	
1.1 Plaguicidas	1
1.1.1 Plaguicidas organofosforados: Características generales	3
1.1.1.1 Mecanismo de acción	4
1.1.1.2 Mecanismo de degradación	5
1.1.1.3 Legislación	5
1.1.1.4 Métodos de análisis	6
1.2 Cromatografía. Características generales	7
<i>CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS</i>	
2.1 Reactivos	11
2.2 Material y equipo	11
2.3 Métodos	12
2.3.1 Evaluación de Parámetros Cromatográficos	12
2.3.2 Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC)	12
2.3.3 Curva de calibración de Clorpirifos	13
2.3.4 Porcentaje de Recobro de Clorpirifos	14
2.3.5 Cuantificación de Clorpirifos en muestras de agua provenientes de baños de inmersión para ganado	14
2.3.6 Estabilidad de Clorpirifos	14

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1	Determinación de Parámetros Cromatográficos	16
3.2	Límite Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC)	17
3.3	Curva de calibración de Clorpirifos	19
3.4	Determinación del porcentaje de recobro de Clorpirifos	20
3.5	Cuantificación de Clorpirifos en muestras de agua provenientes de baños de inmersión para ganado	21
3.6	Estabilidad de Clorpirifos	23

	CONCLUSIONES	26
--	---------------------	----

APÉNDICES

	Apéndice 1. Características generales de Clorpirifos	27
	Apéndice 2. Características de reactivos y equipos	30
	Apéndice 3. Figuras	31
	Figura 1. Esquema de una sinapsis química	31
	Figura 2. Formación del complejo enzima-sustrato	32
	Figura 3. Formación del complejo enzima-organofosforado	33
	Figura 4. Esquema básico de un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE)	34
	Apéndice 4. Fórmulas de parámetros cromatográficos	35
	Apéndice 5. Cromatogramas	36
	Figura 8. Estándar de Clorpirifos	36
	Figura 9. Clorpirifos en muestra de agua proveniente de baños de inmersión para ganado	37
	Apéndice 6. Glosario	38

	BIBLIOGRAFÍA	40
--	---------------------	----

Introducción

En la actualidad, los productores agropecuarios en México dependen aún del uso de plaguicidas con el fin de eliminar y controlar la presencia de insectos, hongos o plantas responsables del surgimiento de ciertas enfermedades en los cultivos y en el ganado, que afectan la producción agrícola y pecuaria, ocasionando pérdidas económicas. Un ejemplo es la presencia en los diferentes estados de la República Mexicana de la Garrapata “*Boophilus. Spp*” que provoca graves alteraciones en los animales infectados, lo que incide principalmente en la disminución de la producción de carne y leche, además de transmitir enfermedades como la *Bebesiosis bovina* y la *Anaplasmosis*, que ocasionan la muerte y generan una gran cantidad de animales improductivos, Todo ello repercute desfavorablemente en la economía de la actividad ganadera. Para combatirla se utiliza un acaricida del grupo de los organofosforados, el *Clorpirifos*, un analito moderadamente peligroso, inhibidor de la acetilcolinesterasa de la garrapata, poco resistente en el ambiente. Los ganaderos hoy en día, emplean el *Clorpirifos* en suspensión acuosa, en los baños de inmersión, donde se hace pasar el ganado con el objeto de eliminar la garrapata adherida a su piel. Sin embargo, esta acción depende del área de contacto, del intervalo de recarga, del tiempo de exposición y de la concentración de *Clorpirifos* en el baño. El manejo de estas variables y la importancia del análisis de estos compuestos, da como resultado el presente trabajo, que tiene como objetivo establecer las condiciones experimentales del análisis cualitativo y cuantitativo del plaguicida, *Clorpirifos* en muestras acuosas de baños de inmersión para ganado por la técnica analítica de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE).

CAPÍTULO 1

GENERALIDADES

1.1 Plaguicidas

Los plaguicidas son sustancias o mezcla de sustancias que se destinan a controlar plagas, incluidos los vectores de enfermedades humanas y de animales, así como las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal.

Existen varias formas de clasificar a los plaguicidas; entre las más comunes están las siguientes:

- Por su naturaleza química: orgánicos e inorgánicos.
- Por su modo de acción: contacto, ingestión, fumigante, sistémicos, repelente y defoliante.
- Por su composición: organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, ciclodienos y piretrinas.
- Por su uso y tipo de organismo que afectan: insecticidas, herbicidas, fungicidas, nematicidas, molusquicidas, helicidas, rodenticidas, corvicidas, corvifugos y productos que afectan a mamíferos mayores.
- De acuerdo a su persistencia en el ambiente: ligeramente persistentes (menos de 4 semanas), poco persistentes (de 4-26 semanas), medianamente persistentes (27-52 semanas), altamente persistentes (mas de un año y menos de 20) y permanentes (mas de 20 años).
- En base a su concentración: Plaguicida técnico y Plaguicida formulado [1, 2, 4].

El uso inadecuado de los plaguicidas origina con el tiempo plagas resistentes o inmunes, por lo que agricultores y ganaderos entre otros, se ven en la necesidad de agregar mayores cantidades de estas sustancias. La aplicación por lo general inicia con un compuesto organoclorado (OCL), que con el tiempo manifiesta su resistencia, ya sea en la plaga primaria o secundaria, lo cual provoca que los productores añadan mayores cantidades de plaguicidas o nuevos plaguicidas a su producción agrícola y ganadera. Con frecuencia, el cambio se da hacia un compuesto organofosforado (OF) o carbamato que no dañe drásticamente al ecosistema. Sin depredadores ni parásitos, las especies que no tenían importancia como plagas se convierten en dañinas. Para combatirlas se recurre al mayor uso de compuestos químicos. De este modo se origina lo que muchos investigadores denominan como “circulo vicioso de los plaguicidas” [2].

La persistencia de un plaguicida es la duración de este sin cambio molecular, a partir del momento de su aplicación en el ambiente. Esta característica, aunada a su movilidad, incrementa el riesgo de estos productos para el medio ambiente, la salud de los cultivos, de los animales y en especial del ser humano.

Existen factores de persistencia que influyen en los plaguicidas, estos a su vez están influenciados por las condiciones específicas del lugar en donde se aplica un plaguicida, como el clima, tipo de suelo, cantidad de materia orgánica y los microorganismos en él, por esto, la persistencia de un plaguicida varía de un lugar a otro.

Los principales factores de persistencia son:

- Fotodescomposición: es el factor principal que influye en la degradación ambiental de los plaguicidas.
- Descomposición química: se lleva a cabo por efecto de una serie de reacciones químicas tales como la oxidación, reducción e hidrólisis, las cuales tienen lugar en el suelo, en el aire y en los organismos.
- Acción microbiana: donde los plaguicidas son compuestos orgánicos que sirven como fuente de energía y nutrientes para la mayoría de los microorganismos, que a la vez los degradan, conforme se van incorporando al suelo [1].

Antiguamente los plaguicidas más utilizados eran los OCL, por su bajo costo, pero el abuso de estos, su prolongada acción residual en el ambiente y su elevado grado de bioacumulación, provocaron su restricción sobre todo en países desarrollados. Estos países optaron por emplear plaguicidas OF y carbamatos, que al ser utilizados de manera adecuada, tienen una menor acción residual y bajo grado de bioacumulación, de lo contrario, es fácil encontrarlos como contaminantes en el ambiente provocando intoxicaciones desde agudas hasta crónicas en las poblaciones expuestas de manera directa o indirectamente [5].

En países “en vías de desarrollo” como México, el uso de plaguicidas OCL, OF y carbamatos, se ha dado de una manera indiscriminada, lo cual se debe a la falta de cultura y conciencia de los riesgos que pueden ocurrir al utilizar estos compuestos químicos de manera incorrecta, lo que origina intoxicaciones de diversos grados y efectos nocivos que pueden presentarse a mediano o largo plazo, tales como carcinogénesis, teratogénesis, mutagénesis y esterilidad entre otros. Asociado a lo anterior, la falta de leyes o normas específicas que rijan el uso, la manipulación, el Límite Máximo Residual (LMR) y efectos toxicológicos de los plaguicidas más empleados. En México, la legislación cuenta con el catálogo oficial de plaguicidas publicado en 1994 por la COMISION INTERSECRETARIAL PARA EL CONTROL DEL PROCESO Y USO DE PLAGUICIDAS, FERTILIZANTES Y SUSTANCIAS TOXICAS (CICOPLAFEST), en el que se aprueban el uso de 97 insecticidas, 70 herbicidas, 71 fungicidas, 8 fumigantes, 12 rodenticidas y 3 nematicidas, además de establecer la Ingesta Diaria Admisible (IDA), el uso, la persistencia, el Límite Máximo Residual (LMR) y la categoría toxicológica del producto técnico, entre otros [1, 6].

Al mismo tiempo existen algunas normas y metodologías para el análisis de ciertos compuestos OCL (malatión, paratión, aldrín, etc.) en matrices como agua, suelo y aire, los cuales no son aplicables para varios compuestos organofosforados. Esta falta de normas y métodos de análisis para su correcta detección, hace difícil que en la práctica se implementen técnicas documentadas existentes, y sobre todo que se desarrollen nuevas.

1.1.1 Plaguicidas organofosforados: Características generales

De acuerdo al catálogo oficial de plaguicidas, editado en 1994 por la CICOPALFEST, los plaguicidas OF, son compuestos derivados del ácido fosfórico, en donde uno o más de los oxígenos del ácido pueden encontrarse sustituidos por azufre y sus radicales orgánicos, encontrándose varias combinaciones. Los sustituyentes del ácido pueden ser grupos alquilo, alcoxi, o alquil-litio de cadena corta, o bien, grupos amida o átomos de azufre.

En 1820, uno de los primeros químicos en sintetizar un OF fue Lassaige al hacer reaccionar el ácido fosfórico con alcohol. En 1854 Clemont prepara el tetraetilpirofosfato (TEPP), el primer insecticida empleado en la segunda guerra mundial, mientras que al mismo tiempo Schrader sintetiza gases nerviosos, el Tabún y Sarín [1, 7].

Los plaguicidas son degradados con relativa facilidad en el ambiente por hidrólisis al ser algunos muy solubles en agua. Los compuestos con una solubilidad en agua mayor a 500 ppm son muy móviles en el suelo y en los ecosistemas; su mayor concentración se encuentra en los ecosistemas acuáticos; los compuestos con solubilidad en agua mayor a 25 ppm no persisten en los seres vivos, a estos corresponden los compuestos OF, en tanto aquellos con solubilidad en agua menor a 25 ppm, tienden a movilizarse en los suelos y concentrarse en los organismos, tal es el caso de los compuestos OCL.

Los compuestos OF poseen algunas ventajas y desventajas sobre los compuestos OCL, las cuales son:

VENTAJAS

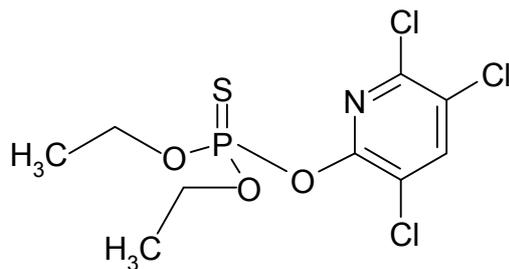
- Baja persistencia en el ambiente
- No se acumulan en el organismo
- Bajo potencial de carcinogenicidad
- La presencia de iones metálicos, catalizan mas rápido su hidrólisis

DESVANTAJAS

- Mayor toxicidad aguda
- Se absorbe bien por inhalación, ingestión y vía cutánea
- Son fotosensibles

La estructura química de los OF puede ser muy variada y de ella dependerá su toxicidad y el mecanismo de acción molecular.

El Clorpirifos es un plaguicida OF y es uno de los que más comúnmente se emplea en la industria agropecuaria. Introducido por la compañía química Dow en 1965, se clasifica como un plaguicida tóxico al contacto con la piel y por inhalación, poco persistente, de amplio espectro, empleado para el control de mosquitos, moscas, plagas de follaje, larvas acuáticas, garrapatas, etc. Su vida media en disolución metanólica a pH = 6 es de 1930 días y a pH = 9.96 es de 72 días. Se utiliza con mas frecuencia en la industria ganadera para el control y eliminación de la garrapata bovina, la cual origina ciertas enfermedades en el ganado como la *Bebesiosis bovina* y la *Anaplasmosis* [8, 9]



Clorpirifos

1.1.1.1 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de los plaguicidas OF es por inhibición de la acetilcolinesterasa. El fenómeno ocurre a nivel de sinapsis nerviosas en donde el neurotransmisor acetilcolina actúa sobre la membrana posináptica a la que despolariza. Esta membrana excita a las células efectoras: glándulas, fibras musculares lisas, fibras musculares estriadas y otras neuronas. Una vez conseguido su objetivo, la función de este neurotransmisor debe terminar, lo que ocurre por la acción de la acetilcolinesterasa, enzima que rápidamente hidroliza a la acetilcolina, por lo que esta deja de actuar y las células efectoras entran en reposo, para volverse a activar cuando el organismo lo demande (Apéndice 3, Figuras 1 y 2).

El átomo central de fósforo de los plaguicidas o compuestos OF tiene una deficiencia de electrones y esta configuración favorece la atracción hacia el sitio estérico de la acetilcolinesterasa que posee un excedente de electrones, donde el fósforo forma una unión covalente con el grupo nucleofílico de la enzima (Apéndice 3, Figura 3).

Por lo tanto, se genera una mayor cantidad de impulsos a las células efectoras y si ésta estimulación continúa, causa las siguientes manifestaciones tóxicas:

- a) Síndrome Muscarínico: se manifiesta por estimulación de las glándulas y fibras musculares lisas, lo que causa vómito, sudoración, diarrea, salivación, lagrimeo y abundantes secreciones bronquiales y contracción de las pupilas “como punta alfiler” (miosis).
- b) Síndrome Nicotínico: se manifiesta por la acción de las fibras musculares estriadas, lo que provoca presión del tórax, calambres de los músculos abdominales y de las extremidades, temblores, bradicardia y trastornos del ritmo cardiaco.
- c) Síndrome Neurológico: se manifiesta por sobreestimulación de otras neuronas, que se caracterizan por irritabilidad, conducta psicótica, pérdida brusca de la conciencia y convulsiones. La muerte ocurre por depresión respiratoria, edema pulmonar o bradicardia extrema [1,2,7,10].

1.1.1.2 Mecanismo de degradación

Todos los plaguicidas OF se degradan por hidrólisis en el hígado y en otros tejidos, generalmente durante las horas en las que ocurre la absorción. Su biotransformación se hace mediante enzimas de tipo oxidasas, hidrolasas y transferasas hepáticas. Los productos de la degradación o metabolitos son de baja toxicidad y se excretan en su mayoría en la orina y en menor cantidad en heces y aire aspirado. Su máxima excreción se alcanza a los 2 días y luego disminuye rápidamente. Sin embargo algunos se convierten en productos intermedios que son, inclusive, más tóxicos que el compuesto original [1, 6, 11].

Una prueba que confirma el diagnóstico de exposición a plaguicidas OF es la depresión de la actividad de la acetilcolinesterasa en la sangre, en el plasma o en los glóbulos rojos, la cual es una evidencia de que hubo una absorción excesiva de plaguicidas OF. La depresión de la colinesterasa en el plasma persiste con frecuencia de 1 a 3 semanas y la depresión de la colinesterasa en los glóbulos rojos persiste hasta 12 semanas. Los metabolitos que producen los OF comunmente se detectan en la orina de los pacientes entre las 12 y 48 horas después de una absorción considerable del tóxico. La determinación de los niveles de colinesterasa hemática constituye una guía de primer orden para conocer la efectividad de las prácticas de higiene industrial y la aplicación de estos plaguicidas [1].

En lo correspondiente al Clorpirifos, este compuesto es empleado en forma de fosforotioato el cual es un inhibidor débil de la colinesterasa. Esta forma es convertida "*in vivo*" desde la forma azufrada (P=S) a un éster fosfato u oxon (P=O), que posee una fuerte acción sobre la colinesterasa, esta bioactivación ocurre en el hígado por la acción de la enzima CYP3A4 la principal isoforma del citocromo P450 (CYP).

Una sola dosis de Clorpirifos (^{36}Cl) administrada a las ratas, les provoca una rápida absorción del mismo, con una excreción en la orina (90%) y en heces (10%). Los productos excretados son 3,5,6-tricloro-2-piridil fosfato (75 a 80%), o Clorpirifos-oxon, 3,5,6-tricloro-2-piridinol (15-20%) o TCP, y trazas de Clorpirifos no metabolizado. El Clorpirifos es distribuido inicialmente en los tejidos y almacenado en la grasa, después es movilizado y excretado lentamente, con una vida media alrededor de 62 h [6, 12, 14].

1.1.1.3 Legislación

En el marco jurídico de México se cuenta con el Catálogo Oficial de plaguicidas editado por la CICLOPAFETS; la NOM-AA -105-1988. Plaguicidas determinación de residuos en suelos-Método de toma de muestras; NOM-045-SSA1-1993, que establece los requisitos para contener los plaguicidas. Envase y embalaje, el proyecto de norma con la designación NOM-043-SSA1-1993, que también se relaciona con el almacenamiento de los plaguicidas, pero aun no existe norma alguna editada y aprobada que especifique la manera adecuada para la recolección de la(s) muestra(s), su manipulación, conservación, almacenamiento y el o los análisis químicos, fisicoquímicos y microbiológicos que se deben llevar a cabo, para la identificación y cuantificación de ciertos plaguicidas OF que se encuentran como

remanentes en aguas residuales, siendo estas un foco de contaminación cuando llegan a ríos, lagos, mantos freáticos y sistemas de agua potable, que muchas personas diariamente emplean para sus necesidades domésticas.

1.1.1.4 Métodos de análisis

En la actualidad se han desarrollado diversos métodos Cromatográficos para la identificación y cuantificación del Clorpirifos y sus metabolitos en muestras de plasma y orina. Los métodos Cromatográficos más utilizados son: Cromatografía en Papel, Cromatografía de Gases con Detector de Ionización de Flama, Cromatografía de Gases–Espectrometría de Masas, Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia–Espectrometría de Masas y Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia–Espectroscopia UV/Visible [12]. Esta última técnica es la aplicada en este trabajo en la determinación del Clorpirifos en muestras de agua provenientes de baños de inmersión para ganado.

1.2 Cromatografía. Características generales

En 1906, el botánico ruso Tswett empleó la cromatografía de elución en un experimento que tenía por objeto la separación de la clorofila de extractos vegetales, del cual obtuvo al final bandas de colores que correspondían a carotenos, clorofila y xantofilas. De aquí el origen de la palabra cromatografía, que literalmente, significa “*color escrito*”. Hoy en día se encuentra clasificada como Cromatografía Líquido-Sólido (CLS).

La cromatografía es una técnica analítica que permite separar, aislar e identificar los compuestos químicos de una mezcla. La muestra es distribuida entre dos fases, una estacionaria y una móvil, de tal modo que cada uno de los componentes de la mezcla es selectivamente retenido por la fase estacionaria; ésta puede ser un sólido o un líquido y la fase móvil un líquido, un gas o un fluido supercrítico. Estos principios son la base de la cromatografía en columna, en papel y en capa fina. Estos tipos de Cromatografía, fueron y serán, los pilares en el surgimiento de nuevas técnicas cromatográficas.

La cromatografía de líquidos es un método físico de separación en la que una muestra se distribuye entre dos fases: una fase estacionaria que puede ser un sólido o un líquido y una fase móvil que es un líquido. A pesar de que el primer experimento fue una forma de cromatografía líquida, también es conocida como clásica, que consiste en una columna de vidrio, rellena de un material poroso de un tamaño de partícula cercano a los 200 μm , donde la muestra previamente disuelta en la fase móvil o disolvente, es introducida, para después ser eluida por la acción de la gravedad y recolectada en la base de la columna. No fue sino hasta 1968 que se produjo un avance considerable en esta técnica que por tantos años había permanecido olvidada; este avance fue gradual, lo que dio paso a la introducción de un tipo de cromatografía de alta eficiencia y de sistemas de detección continua, conocida actualmente por sus siglas en inglés como HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ó CLAE por sus siglas en español (Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia) [15].

Un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia está constituido por las siguientes partes. (Apéndice 3, Figura 4)

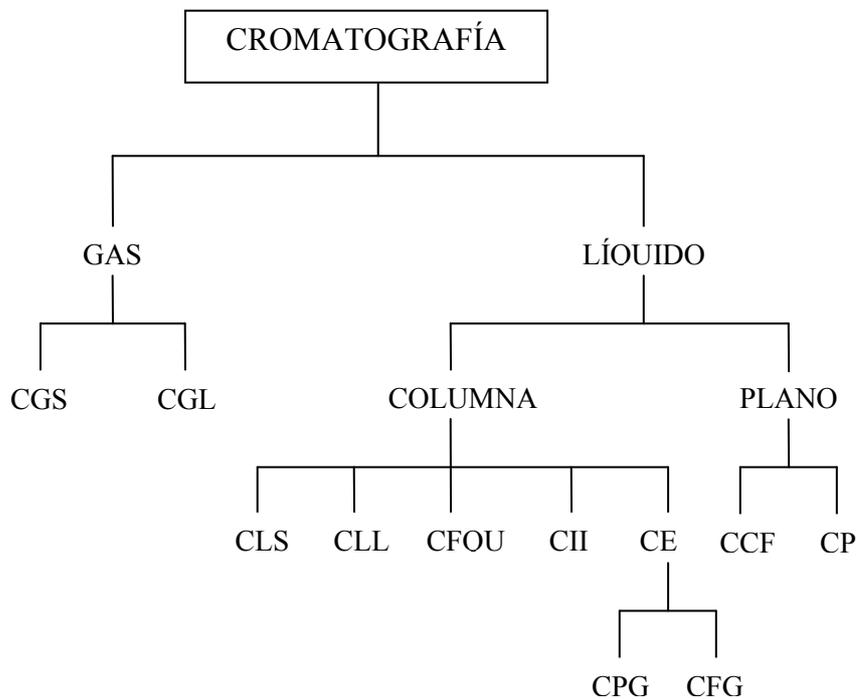
- 1) Contenedor de la fase móvil.
- 2) Bomba de alta presión.
- 3) Inyector.
- 4) Columna cromatográfica de polaridad determinada.
- 5) Detector.
- 6) Sistema de adquisición de datos (registrador, integrador, computadora).

Clasificación cromatográfica.

Existen varias formas de clasificar las técnicas cromatográficas.

- Finalidad de la separación:
 - Analítica
 - Preparativa
- Naturaleza de la fase estacionaria y la fase móvil:
 - Polar
 - No polar
- Mecanismo de separación:
 - Partición
 - Adsorción
 - Intercambio iónico
 - Permeación / exclusión

Al considerar el estado físico de la fase móvil y de la fase estacionaria, se tiene la siguiente clasificación:



La Fase Estacionaria es la porción inmóvil del sistema y la Fase Activa que esta contenida en un soporte inerte, debe ser una sustancia no volátil a la temperatura de trabajo y tener una afinidad diferente a los diversos componentes de una muestra.

Las propiedades deseables son: baja volatilidad, estabilidad térmica, inercia química y actuar como disolvente. La elección adecuada de la fase estacionaria es una etapa crítica para el éxito de la separación. Se clasifican en Polares (separación de sustancias polares o medianamente polares) y No polares (separación de sustancias no polares o poco polares).

Una operación en **Fase Normal**, significa que se tiene una fase estacionaria polar y se emplea una fase móvil de polaridad baja. Entonces las moléculas son mas o menos retenidas, dependiendo de la fuerza de sus interacciones con los grupos funcionales de empaque.

La mayor parte de los empaques de fase normal están hechos con Sílica gel (grupos funcionales silanol (Si-OH)) que en cierto momento se pueden encontrar ligados a grupos funcionales polares como: -CN, -NO₂, O -NH₂.

La **Fase Reversa**, significa que se tiene una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar. La fase mas comúnmente usada es C-18, en la cual se tienen grupos octadecil (C₁₈H₃₇) en la superficie.

En la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) es posible analizar compuestos orgánicos e inorgánicos, iónicos y de alto peso molecular. Uno de los requisitos es encontrar una fase estacionaria adecuada que separe selectivamente los componentes de la muestra, lo cual en teoría siempre es posible, pero en la práctica puede resultar difícil.

La CLAE se puede llevar a cabo mediante un mecanismo de separación como: reparto líquido-líquido, intercambio iónico, exclusión molecular, afinidad y adsorción líquido-sólido. La cromatografía de adsorción se realiza directamente en la superficie de las partículas de determinada naturaleza.

En la cromatografía de gases la fase móvil es un gas inerte que actúa únicamente como acarreador de la muestra a través de la columna, en un tubo capilar que contiene la fase estacionaria. La muestra, o algún derivado de ella debe ser volátil para utilizar esta técnica.

Para una mejor comprensión, se enlistan algunas de las características más importantes de las dos técnicas en la **Tabla 1**. [14, 15]

Tabla 1. Características de la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia y de la Cromatografía de Gases.

Características	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia	Cromatografía de Gases
Requerimientos de la muestra	Soluble	Volátil y termoestable
Automatización	Posible	Posible
La separación puede mejorar	Por medio de un cambio en la fase estacionaria y en la fase móvil	Por medio de un cambio en la fase estacionaria y en la temperatura de columna
Tiempo de análisis	Minutos – horas	Minutos
Numero de platos teóricos	5,000 - 20,000	20,000 – 150,000 en columnas capilares
Elución programada	Gradiente de fase móvil	Gradiente de temperatura

Ventajas y Desventajas de la CLAE y CG

La CLAE complementa la CG, debido a que se pueden analizar muestras termolábiles y no volátiles, las cuales resultan difíciles de determinar por CG, algunas de las ventajas y desventajas de cada una de estas técnicas se presentan a continuación:

CLAE

Ventajas: Buena resolución, análisis de compuestos de alto peso molecular (orgánicos, inorgánicos, iónicos y covalentes).

Desventajas: Sólidos disueltos en la fase móvil, menor número de platos teóricos. Es una técnica menos sensible que depende del tipo de detector y del tiempo de análisis que va de minutos a horas.

CG

Ventajas: Excelente resolución, análisis de compuestos volátiles. Debido a las dimensiones de las columnas presenta un mayor número de platos teóricos. Es una técnica más sensible que depende del tipo de detector; el tiempo de análisis es en minutos.

Desventajas: Las muestras deben ser volátiles y termoestables. Menos versátil debido a que para solutos termolábiles deben de formarse previamente sus derivados volátiles.
[15]

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos

- Acetonitrilo grado cromatográfico
- Agua destilada
- Ácido acético glacial
- Estándar de Acenafteno
- Estándar de Clorpirifos grado reactivo (Lote 048)

2.2 Material y equipo

- Balanza analítica marca Ohaus[®]
- Probeta graduada de 200 mL
- Agitador de vidrio
- Espátula
- Vidrio de reloj
- Soporte universal
- Vasos de precipitados de 250 mL
- Pipetas pasteur de plástico
- Pipetas graduadas de 1mL y 5mL
- Papel filtro Whatman de 15.0 cm # 4 (Ashlees[®])
- Viales de vidrio color ámbar
- Matraces Erlenmeyer de 50 mL y 200 mL
- Matraces aforados de 5 mL y 10 mL
- Parrilla con agitación magnética
- Potenciómetro digital marca OAKTON[®]
- Büchner y matraz kitazato
- Equipo cromatográfico HPLC modular marca Waters[®] con detector UV-Visible de longitud de onda variable
- Columna Cromatográfica marca Waters[®], 3.9x150 mm, Symmetry[®] C₁₈ 5 µm
- Sistema de filtración marca Millipore
- Membrana Millipore
- Microjeringa de 100 µL

Condiciones de trabajo

- Fase móvil Acetonitrilo-Agua 60/40 % v/v, Longitud de onda 254 nm [Evaluación de la columna]
- Fase móvil Acetonitrilo-Agua 80/20 % v/v (pH 3.25 Ácido Acético glacial), Longitud de onda 288 nm [Análisis de Clorpirifos]
- Flujo 1 mL/min (ϕ)

2.3 Métodos

2.3.1 Evaluación de Parámetros Cromatográficos

Se establecieron las condiciones cromatográficas para la evaluación previa de la columna

- Longitud de onda (λ) 254 nm
- Volumen de inyección 40 μ L
- Velocidad de flujo 1 mL/min
- Velocidad de papel (Cs) 1 cm/min
- Fase móvil (FM) Acetonitrilo-agua 60/40 % v/v

Una vez que se establecieron las condiciones cromatográficas, se inyectaron 40 μ L de una disolución de acenafteno de concentración de 10 mg/mL.

Se midieron las siguientes variables:

- Tiempo muerto (t_0)
- Tiempo de retención (t_r) de acenafteno
- Tiempo de retención ajustado (t_r')
- Ancho del pico medido a la mitad de altura ($w_{1/2}$)

Y se calcularon los parámetros cromatográficos:

- Factor de capacidad (k')
- Número de platos teóricos (N)
- Altura Equivalente a un Plato Teórico (H)

Los cuales indicaron la eficiencia de la columna cromatográfica.

2.3.2 Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC)

Límite Detección

Se preparó una disolución de Clorpirifos de concentración 1.03 mg/mL en acetonitrilo, de la disolución anterior se prepararon las siguientes disoluciones en fase móvil: 0.103 mg/mL, 0.020 mg/mL, 0.004 mg/mL, 8.24 E-4 mg/mL y 16.48 E-5 mg/mL. Se inyectaron 40 μ L de cada disolución.

La disolución de 16.48 E-5 mg/mL, fue la que se empleo para obtener sus áreas y se calcular el límite de detección con la ecuación 1.

$$LD = (2 \times t_{\alpha}) \left(\sigma / (n)^{1/2} \right) \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

Donde: $t_{\alpha/2}$ valor de la t-student con α igual a 0.05 reportado en tablas [19].
 σ desviación estándar de la muestra
 n número de observaciones o mediciones hechas

Límite de Cuantificación

Con el valor de concentración (mg/mL) de la desviación estándar (σ) utilizada en el LD, se calculó el límite de cuantificación, mediante la ecuación 2.

$$LC = (100 / E\%) (t_{\alpha/2}) (\sigma / (n)^{1/2}) \dots\dots\dots \text{Ecuación 2}$$

Donde: $t_{\alpha/2}$ valor de la t-student con $\alpha/2$ igual a 0.025 reportado en tablas [19].
 σ desviación estándar de la muestra
 n número de observaciones o mediciones hechas
E% error porcentual máximo aceptable al reportar una concentración

2.3.3 Curva de calibración de Clorpirifos

A partir de una disolución “stock” de Clorpirifos ($C = 1 \text{ mg/mL}$) se preparó la curva de calibración como se indica en la tabla 2.

Tabla 2. Disoluciones de la curva calibración de Clorpirifos.

(mL/5 mL)	C (mg/mL)
0.25	0.05
0.5	0.1
1.0	0.2
1.5	0.3
2.0	0.4
2.5	0.5

Se inyectaron 40 μL de cada una de las disoluciones de la curva de calibración.

Concluidas las determinaciones, se prosiguió a graficar los resultados obtenidos de las áreas y las concentraciones, mediante el método de estándar externo. La ecuación de la línea recta es

$$A = mC + b \dots\dots\dots \text{Ecuación (3)}$$

Donde: el área obtenida (**A**) = y
la pendiente de la recta (**m**) = m
la concentración del Clorpirifos en mg/mL (**C**) = x
la ordenada al origen (**b**) = b

2.3.4 Porcentaje de Recobro de Clorpirifos

Se pesaron por triplicado 10.0 mg del estándar de Clorpirifos. Cada uno se disolvió y se ajustó el volumen de aforo a 10 mL con Acetonitrilo. Esta disolución presentó una concentración de 1 mg/mL.

De la disolución anterior se preparó una disolución de 0.5 mg/mL y de ésta una disolución de 0.3 mg/mL, de la que se inyectaron 40 µL en el cromatógrafo de líquidos.

Las áreas obtenidas, se interpolaron en la curva de calibración, así se determinaron las concentraciones, y se calculó el porcentaje de recobro.

2.3.5 Cuantificación de Clorpirifos en muestras de agua provenientes de baños de inmersión para ganado

Se miden 5 mL de cada una de las 24 muestras, después de agitarlas vigorosamente, se filtran al vacío y se ajusta su volumen de aforo a 10 mL con acetonitrilo.

Se inyectan 40 µL de cada muestra problema y se analizan por Cromatografía de Líquidos.

Las áreas obtenidas se interpolan en la curva de calibración, para obtener las concentraciones y tomando en cuenta las diluciones realizadas, se determinó la concentración real de Clorpirifos en las muestras con un 73.86% de recobro.

2.3.6 Estabilidad de Clorpirifos

Se preparó una disolución de estándar de Clorpirifos con una concentración de 0.2 mg/mL.

Con la ayuda de una tabla de números aleatorios, se eligió el frasco con muestra de agua proveniente de baños de inmersión para ganado, marcado con el # 2.

La muestra se agitó y de ésta se midieron 5 mL, después este volumen se filtró al vacío.

Una vez filtrada se ajustó a un volumen de aforo de 10 mL con acetonitrilo.

Ya preparadas las disoluciones del estándar y de la muestra # 2, se expusieron a condiciones normales de luz y temperatura, por un lapso de cinco semanas, llevando a cabo cada semana, el análisis cromatográfico de las disoluciones (se inyecta un volumen de 40 µL del estándar y por triplicado un volumen de 40 µL de la muestra).

Se determinó el área del estándar y el área promedio de la muestra en las fechas citadas.

A partir de la ecuación de la curva de calibración se calculó la concentración de cada disolución.

Por último, se hizo una gráfica de control de calidad con las concentraciones del estándar en función de las fechas de exposición. Una gráfica de estabilidad del Clorpirifos, utilizando las concentraciones y el promedio de estas en función nuevamente de las fechas de exposición.

CAPÍTULO 3

Resultados y discusión

3.1 Determinación de Parámetros Cromatográficos

La evaluación de la columna cromatográfica se llevó a cabo a temperatura ambiente, con una disolución de acenafteno de concentración 10 mg/mL, en las siguientes condiciones cromatográficas. (**Tabla 3**)

Tabla 3. Condiciones cromatográficas.

Columna Symmetry® C-18	Longitud de onda (λ)	Volumen de inyección	Velocidad de flujo (Φ)
Fase inversa	254 nm	40 μ L	1 mL/min

Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Resultados de la evaluación de la fase estacionaria.

Tiempo muerto (t_0)	Tiempo de retención (t_r) de acenafteno	Tiempo de retención Ajustado (t_r')	Ancho pico medido mitad de altura ($w_{1/2}$)
1.29 min	10.8 min	9.51	3 mm

A partir de los datos anteriores y de aplicarlos en las fórmulas de parámetros cromatográficos (**Apéndice 4**), se determinó el factor de capacidad (k'), el número de platos teóricos (N) y la altura equivalente a un plato teórico (H), los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Resultados de parámetros cromatográficos.

Factor de capacidad (k')	Número de platos teóricos (N)	Altura Equivalente a un Plato Teórico (H)
7.37	7180	0.0208 mm

Se empleó el acenafteno como analito para calcular los parámetros cromatográficos; este analito no presenta propiedades ácido-base, lo que permitió ser utilizado por solo presentar efectos de adsorción.

Con los resultados anteriores se llegó a la conclusión de que esta columna es adecuada para llevar a cabo el análisis cualitativo y cuantitativo del analito en estudio, el plaguicida Clorpirifos.

3.2 Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC)

Se prepararon disoluciones del estándar de Clorpirifos con las siguientes concentraciones: 1.03 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.02 mg/mL, 0.004 mg/mL, 8 E-4 mg/mL y 16.48 E-5 mg/mL. Se inyectaron 40 µL de cada disolución. Las condiciones cromatográficas se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Condiciones cromatográficas para el análisis de Clorpirifos.

Columna Symmetry C-18	Longitud de onda (λ)	Volumen de inyección	Velocidad de flujo (Φ)	Fase móvil MeCN-H ₂ O (pH 3.25 AcOH)
Fase inversa	288 nm	40 µL	1 mL/min	80:20%

MeCN – Acetonitrilo

El límite de detección se determinó con una disolución de Clorpirifos de una concentración de 16.48 E-5 mg/mL, debido a que la señal que mostró fué dos veces mas grande que la señal de ruido. Esta determinación se hizo 7 veces, con la finalidad de obtener suficientes valores de área, para calcular el promedio y la desviación estándar de éstos. (**Tabla 7**)

Con la ecuación (5) se calculó la desviación estándar en términos de área.

$$\sigma = (\sum (X_i - X_{prom})^2 / n-1)^{1/2} \dots\dots\dots \text{Ecuación (5)}$$

Donde σ Desviación estándar
 n Número de observaciones
 $n-1$ Grados de libertad
 $X_i - X_{prom}$ Diferencia del valor inicial menos el valor promedio de las áreas

Tabla 7. Datos (X_i) para el cálculo de la desviación estándar (σ) de las áreas correspondientes a la disolución de estándar de Clorpirifos de concentración 16.48 E-5 mg/mL.

X_i	X_{prom}	$(X_i - X)$	$(X_i - X)^2$
3899	3915	-16	256
4490	3915	575	330625
3661	3915	-254	64516
3821	3915	-94	8836
4163	3915	248	61504
3751	3915	-164	26896
3622	3915	-293	85849
$\Sigma = 27407$			
$X_{prom} = 3915$			

Al sustituir estos valores en la ecuación (5), la desviación estándar (σ) fue de 310.50, cuando $n = 7$ y $\alpha = 0.05$, $t_{\alpha} = t_{0.05} = 1.94$ [19]

Calculo de Límite de Detección (LD)

$$LD = (2 \times t_{\alpha})(\sigma / (n)^{1/2}) \dots\dots\dots \text{Ecuación (1)}$$

Conversión de la (σ) de área a concentración

$$\sigma = 310.50 (16.48 \text{ E-5 mg/mL} / 3915) = 1.31 \text{ E-5 mg/mL}$$

$$\text{grados de libertad} = 6 \quad \text{y} \quad t_{0.05} = 1.94$$

$$LD = (2 \times 1.94)(1.31 \text{ E-5 mg/mL} / (7)^{1/2})$$

$$LD = 1.92 \text{ E-5 mg/mL}$$

$$LD \text{ propuesto (1/10)} \leq LD \text{ calculado} \leq LD \text{ propuesto (10)}$$

$$16.48 \text{ E-5 mg/mL (1/10)} \leq 1.92 \text{ E-5 mg/mL} \leq 16.48 \text{ E-5 mg/mL (10)}$$

$$1.64 \text{ E-5 mg/mL} \leq 1.92 \text{ E-5 mg/mL} \leq 1.64 \text{ E-3 mg/mL}$$

El límite de detección calculado de 1.92 E-5 mg/mL, se encuentra dentro del intervalo del límite de detección, la cantidad mínima que el equipo puede detectar.

Cálculo de Límite de Cuantificación (LC)

Para calcular el límite de cuantificación se consideró un porcentaje de error (E%) del 10%, el valor de la desviación estándar (σ) en términos de concentración de 1.31 E-5 mg/mL, el número de muestras = 6 y un valor de $t_{0.025} = 2.44$.

Estos valores, se sustituyeron en la fórmula de LC, **ecuación 2**.

$$LC = (100 / E\%) (t_{\alpha/2}) (\sigma / (n)^{1/2}) \dots\dots\dots \text{Ecuación (2)}$$

Lo que da por resultado:

$$LC = (100 / 10\%)(2.44)(1.31 \text{ E-5 mg/mL} / (7)^{1/2})$$

$$LC = 1.21 \text{ E-4 mg/mL}$$

El LC es la cantidad mínima de Clorpirifos que se puede cuantificar por cromatografía de líquidos en la técnica propuesta.

3.3 Curva de calibración de Clorpirifos

Por el método de Estándar externo.

A partir de una disolución “stock” de 1.08 mg/mL, se prepararon las siguientes disoluciones para la curva de calibración. (Tabla 8)

Tabla 8. Disoluciones de la curva de calibración de Clorpirifos.

Alicuota (mL/5mL Fase móvil)	C (mg/mL)	Área
0.25	0.054	766409
0.50	0.108	2140797
1.00	0.216	4211500
1.50	0.324	6572545
2.00	0.432	8347325
2.50	0.540	10300509

Los puntos de la curva de calibración que van de 0.054 a 0.540 mg/mL, cubrieron el intervalo de la respuesta obtenida, al inyectar 40 μ L de una muestra de baño de ganado, seleccionada al azar. Las condiciones cromatográficas de análisis fueron las mismas de la tabla 6.

Se graficaron los datos de concentración (mg/mL) en función de las áreas obtenidas y se hizo el ajuste por regresión lineal, los resultados se presentan en el siguiente gráfico (Figura 5).

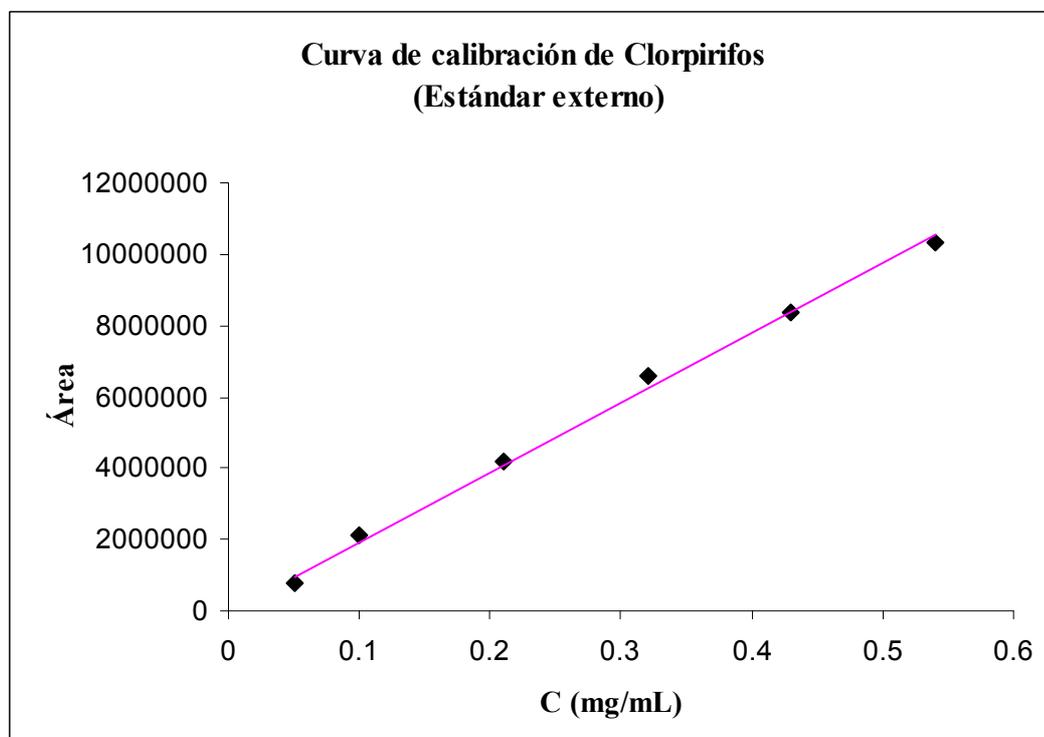


Figura 5. Curva de calibración de Clorpirifos, $A = f(C)$

Regresión lineal.

Ecuación de la recta $y = 2 \text{ E}7 x - 4 \text{ E}5$ Ecuación (3)

$$R^2 = 0.9971$$

$$R = 0.9985$$

$$m = 2 \text{ E}7$$

$$b = - 4 \text{ E}5$$

La curva de calibración presentó un comportamiento lineal, es decir, la concentración fue directamente proporcional al área obtenida. El tiempo de retención para el estándar Clorpirifos fue de 4.90 minutos (Apéndice 5, Figura 8).

3.4 Determinación del porcentaje de recobro de Clorpirifos

El recobro es la evaluación del procedimiento experimental propuesto en el análisis de las muestras. Se llevó a cabo con una disolución de estándar de Clorpirifos que se analizó en el cromatógrafo de líquidos bajo las mismas condiciones experimentales aplicadas a las muestras problema.

Se pesó por triplicado 10.0 mg de estándar de Clorpirifos y se realizaron las correspondientes diluciones hasta obtener una de 0.3 mg/mL, de esta última se inyectó un volumen de 40 μ L, bajo las mismas condiciones cromatográficas de análisis que se muestran en la **Tabla 6**.

Las áreas obtenidas se interpolaron en la curva de calibración, las concentraciones obtenidas se corrigieron por el factor de dilución 3.3333 para determinar la concentración real de las disoluciones y de estas el porcentaje de recobro.

Los resultados experimentales del recobro se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Porcentaje de recobro de Clorpirifos.

Área	Conc. (mg/mL)	Recobro
4273626	0.6843	73.86 %
5109136	0.8163	
4472671	0.7156	
X = 4618477	X = 0.7386	

Esto significa, de los 10.0 mg de estándar de Clorpirifos que se pesaron al inicio del experimento, solo se recuperaron 7.386 mg al final del tratamiento experimental.

Es importante conocer este porcentaje para determinar la cantidad de analito que se pierde durante el tratamiento de la muestra y reportar los resultados en base a este.

3.5 Cuantificación de Clorpirifos en muestras de agua provenientes de baños de inmersión para ganado

Los baños a nivel de campo se prepararon disolviendo un litro de disolución comercial de Clorpirifos en 1000 litros de agua, que es la capacidad de los baños de inmersión. Las recargas se hicieron disolviendo 1.5 litros de la muestra comercial de Clorpirifos a cada baño; se pasaron los animales para su tratamiento de eliminación de la garrapata y se recolectaron las muestras en uno de los baños, las cuales se etiquetaron en orden creciente y con su respectivo número de animales bañados, se analizaron por el método descrito en el inciso 2.3.5. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 10**, bajo las mismas condiciones cromatográficas indicadas en la **Tabla 6**.

Tabla 10. Concentración de Clorpirifos en muestras de agua provenientes de baños de inmersión para ganado, donde R = recarga.

Numero de animales bañados	Muestra	Area	Conc. (mg/mL)	ppm	(73.86%) ppm	(100%) ppm
---	1	4240737 4408572	0.4074 0.4234	407.4 423.4	415.4	562.87
50	2	4675012 4523523	0.4488 0.4342	448.8 434.2	441.5	598.23
100	3	4775712 5113516	0.4482 0.4904	448.2 490.4	469.3	635.90
150	4	5072629 5176780	0.4866 0.4964	486.6 496.4	491.5	665.98
200	5	4324622 4301983	0.4154 0.4132	415.4 413.2	414.3	561.38
200	6 R ^{1a}	6145203 6208339	0.5884 0.5944	588.4 594.4	591.4	801.35
250	7	4496096 4601827	0.4316 0.4416	431.6 441.6	436.6	591.59
300	8	4922565 4385767	0.4722 0.4212	472.2 421.2	446.7	605.28
350	9	3776620 3972725	0.3632 0.3820	363.2 382.0	372.6	504.87
400	10	3815964 4122182	0.3670 0.3962	367.0 396.2	381.6	517.07
450	11	3666541 3764842	0.3528 0.3622	352.8 362.2	357.5	484.41
515	12	4259626 4529186	0.4092 0.4348	409.2 434.8	422.0	571.81
515	13 R ^{2a}	3843139 3869083	0.3696 0.3720	369.6 372.0	370.8	502.43
550	14	4224799 4156586	0.4058 0.3994	405.8 399.4	402.6	545.52
595	15	4144049 4313426	0.3982 0.4142	398.2 414.2	406.2	550.40
653	16	3888968 3745897	0.3740 0.3604	374.0 360.4	367.2	497.56
700	17	2953476 3073791	0.2850 0.2966	285.0 296.6	290.8	394.03
700	18 R ^{3a}	4045965 3857717	0.3888 0.3710	388.8 371.0	379.9	514.76
750	19	4138989 4487958	0.3978 0.4308	397.8 430.8	414.3	561.38
---	20	2472696 2592071	0.2394 0.2508	239.4 250.8	245.1	332.11
---	21	2620241 2760666	0.2534 0.2668	253.4 266.8	260.1	352.43
---	22	3730167 3570226	0.3588 0.3436	358.8 343.6	351.2	475.88
---	23 R ^{4a}	2332347 2395468	0.2260 0.2320	226.0 232.0	229.0	310.29
---	24	3117424 3501213	0.3006 0.3372	300.6 337.2	318.9	432.11

Los resultados obtenidos (**Tabla 10**) de la concentración de Clorpirifos en las muestras, no presentaron una tendencia definida, es decir, al principio existe un aumento y posteriormente una disminución de la concentración conforme se hace pasar a los animales, a demás de aumentar y disminuir la concentración con las recargas. Este comportamiento puede atribuirse a varios factores, por ejemplo: una agitación deficiente en el baño, lo que provocaría sedimentación de Clorpirifos y falta de homogeneidad; una toma incorrecta de la muestra; la cantidad de producto que se agrega en el baño al inicio y en las recargas; el número de animales que se bañan; el tiempo de exposición y el área de contacto en el animal; su degradación por exposición a la luz o a microorganismos; la temperatura del medio ambiente, entre otros. En la figura 9 (Apéndice 4) se presenta un cromatograma proveniente de una de las muestras de baños de inmersión para ganado con un tiempo de retención para el Clorpirifos de 4.93 minutos.

3.6 Estabilidad de Clorpirifos

Al inyectar un volumen de 40 μL del estándar de concentración 0.2 mg/mL y por triplicado un volumen de 40 μL de la muestra # 2, se observaron los siguientes resultados (**Tablas 11 y 12**).

Tabla 11. Áreas del Clorpirifos para la disolución de estándar de 0.2 mg/mL en diferentes fechas.

Fecha Inyección	1 Área	2 Área	3 Área	4 Área	5 Área
1 ^a	4099683	4129667	4196443	4240450	4511687

Tabla 12. Áreas del Clorpirifos para la muestra # 2 en diferentes fechas.

Fecha Inyección	1 Area	2 Area	3 Area	4 Area	5 Área
1 ^a	3656375	3839846	3871282	4344098	4215314
2 ^a	4237747	4306393	4252935	4224333	4397038
3 ^a	5040970	5376231	5794349	6194221	6602336
Prom.	4311697	4507490	4639522	4920884	5071562

Para el estándar de Clorpirifos de concentración 0.2 mg/mL, se determino el área para cada una de las fechas establecidas. En cuanto a la muestra # 2, se determino el área promedio en las mismas fechas que el estándar.

Con la curva de calibración de Clorpirifos y la ecuación de la recta (Figura 5), se determinaron las concentraciones en mg/mL para el estándar y la muestra (**Tabla 13**).

Tabla 13. Concentración de Clorpirifos en el estándar y en la muestra # 2.

Fecha	Concentración del estándar (mg/mL)	Concentración de la muestra (mg/mL)
1	0.22	0.23
2	0.22	0.24
3	0.22	0.24
4	0.23	0.26
5	0.24	0.26

Con los resultados de las concentraciones de Clorpirifos en el estándar y la muestra # 2, se elaboró dos graficas; una gráfica de control de calidad para el estándar (Figura 6) y una gráfica de la estabilidad del Clorpirifos en la muestra # 2 (Figura 7).

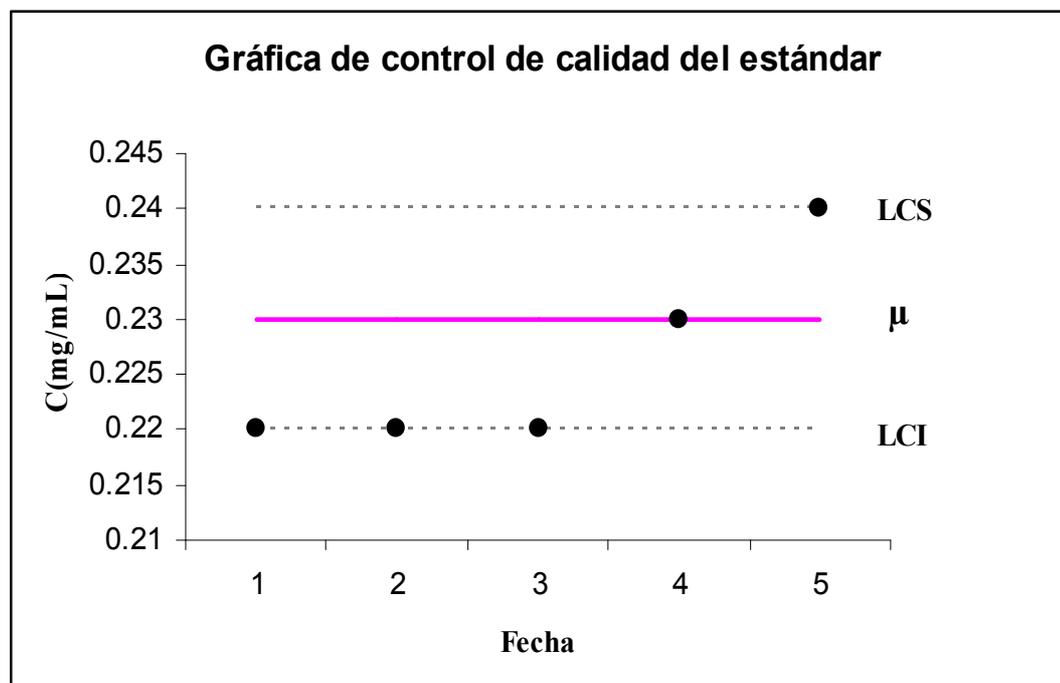


Figura 6. Control de calidad del estándar respecto al tiempo.

Estabilidad del Clorpirifos

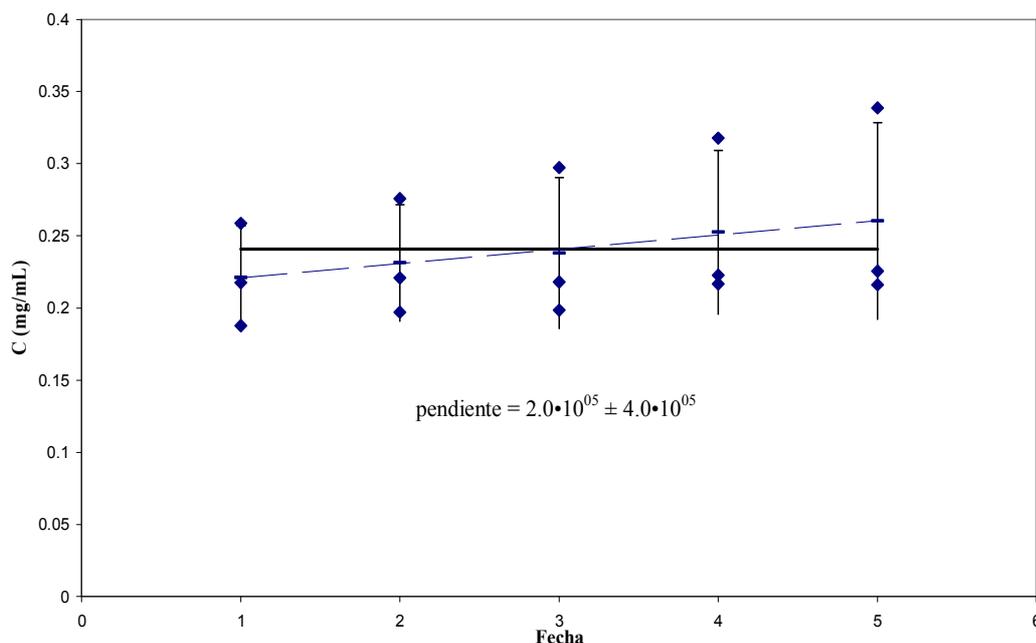


Figura 7. Estabilidad del Clorpirifos

En la figura 6, se observa que en las primeras tres fechas la concentración del estándar de Clorpirifos no varía. Posteriormente la concentración se incrementa en las dos últimas fechas. Además, todas las concentraciones del estándar se encuentran dentro de los límites de control de calidad, aunque las fechas 1, 2, 3 y 5 están sobre los límites de control. Este comportamiento se puede atribuir a pequeños factores como: la intensidad de la luz que incide sobre el estándar, la velocidad de descomposición del Clorpirifos, el número de replicas que se inyectan, entre otros.

En la figura 7, la concentración de Clorpirifos aumenta en la muestra con el transcurso de las fechas, resultando una pendiente de $2.0 \text{ E}+5 \pm 4.0 \text{ E}+5$, que al realizar una prueba de hipótesis sobre esta. Estadísticamente la pendiente es cero, por lo tanto se puede ver que esta variación de concentración es mínima en un intervalo de cinco semanas. Tiempo considerable para llevar a cabo la determinación del contenido de Clorpirifos en muestras acuosas procedentes de baños de inmersión para ganado, desde lugares distantes.

CONCLUSIONES

La columna cromatográfica Symmetry C-18 resultó adecuada, con la eficiencia y retención necesarias para el análisis.

La cantidad mínima detectable de Clorpirifos por la técnica analítica de Cromatografía Líquidos es de $1.92 \cdot 10^{-5}$ mg/mL, es decir, el triple de la señal de ruido del equipo.

El límite de cuantificación, la cantidad más pequeña de Clorpirifos que se puede cuantificar por la técnica analítica de Cromatografía de Líquidos, es de $1.21 \cdot 10^{-4}$ mg/mL.

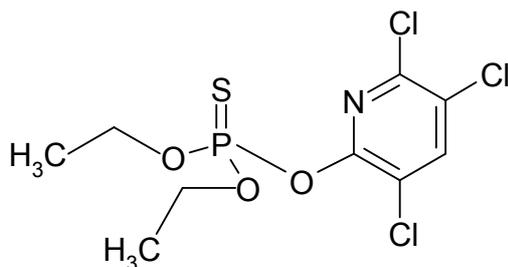
El porcentaje de recobro de Clorpirifos en el procedimiento de extracción propuesto es de 73.86%.

En el intervalo de concentraciones que se utilizó en el análisis cuantitativo de Clorpirifos la respuesta es lineal, como lo demuestra la gráfica obtenida y el coeficiente de determinación (r^2) de 0.9985.

Los resultados obtenidos de la concentración de Clorpirifos en las muestras y en las recargas provenientes de baños de inmersión para ganado, así como las pruebas de estabilidad realizadas a un estándar y una muestra que contienen Clorpirifos, proporcionaron información valiosa acerca de la concentración necesaria y las condiciones de almacenamiento (temperatura y luz), lo cual, contribuirá a mejorar los esquemas de dosificación, proponer el tiempo y las recargas para un determinado número de animales, con el fin de eliminar la garrapata.

APÉNDICES

Apéndice 1. Características generales de Clorpirifos



Características principales.

Denominación química: O,O-dietil-O-(3,5,6-tricloro-2-piridinil)fosforotioato; Dursdan; Lorsban; clorpirifos seco; 3,5,6-tricloro-2-piridil dietil fosforotioato.

Fórmula molecular: $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$

Peso molecular: 350.59 g/mol

Composición porcentual: C 30.83%, H 3.16%, Cl 30.34%, N 4.00%, O 13.69%, P 8.83%, S 9.15%.

Uso: Antiparasitario externo para el control de insectos y ácaros.

Propiedades físicas.

Punto de fusión: 42 °C

Punto de ebullición: 160 °C

Gravedad específica: d_4^{20} 1.308

Coefficiente de reparto (octanol/agua): 50,000

Presión de vapor: 1.87×10^{-5} mmHg a 25 °C

Solubilidad en agua 2 mg/mL a 25 °C, y en disolventes orgánicos como benceno, acetona, cloroformo, disulfuro de carbono, éter dietílico, xileno, cloruro de metileno, metanol.

Exposición ocupacional.

Ingesta Diaria Admisible (IDA) (mg/Kg), para el Etil-Clorpirifos IDA (mg/Kg) 0.01, Metil-Clorpirifos (IDA) (mg/Kg) 0.001

Clasificación toxicológica: Tóxico al contacto con la piel y por inhalación.

Si hay contacto con la piel, lavar inmediatamente con jabón y agua en abundancia.

Usar ropa adecuada y lentes de protección, si la persona presenta mareos o náuseas, acudir con el médico de inmediato y mostrar el envase con la etiqueta del producto.

Incompatibilidades: No mezclar con productos de fuerte reacción alcalina, ni con azufre en medios acuosos, ni con compuestos de cobre.

Usos: Agrícola, pecuario, doméstico, urbano e industrial.

Categoría toxicológica del producto: II, altamente tóxico.

Tipo de plaguicida: Insecticida organofosforado de contacto.

Efectos adversos a la salud: Moderadamente peligroso e irritante dérmico.

Efectos adversos al ambiente: Tóxico para peces, crustáceos y abejas.

Persistencia: Poco persistente.

Tratamiento: Sulfato de atropina 1% (0.2 a 0.5 mg/Kg). También puede usarse la pralidoxima, para facilitar la recomposición de la acetilcolinesterasa.

Condiciones de almacenamiento: Debe conservarse en lugar fresco, seco y protegido de la luz.

Efectos toxicológicos.

Toxicidad aguda

El Clorpirifos es moderadamente tóxico en humanos, puede afectar el sistema nervioso central, el sistema cardiovascular, el sistema respiratorio e irrita piel y ojos.

Los síntomas de una exposición aguda son: entumecimiento, sensación de comezón, falta de coordinación, dolor de cabeza, mareos, temblor, náuseas, calambres abdominales, sudoración, visión borrosa, dificultad para respirar o depresión respiratoria y disminución del latido del corazón.

En las **Tablas 14 y 15**, se presentan las dosis oral DL_{50} y la dosis dérmica DL_{50} en diferentes especies de animales.

Tabla 14. Dosis oral DL_{50} de Clorpirifos en diferentes especies de animales.

Especie	DL_{50}
Ratas	95-270 mg/Kg
Ratones	60 mg/Kg
Conejos	1000 mg/Kg
Pollos	32 mg/Kg
Cerdos	500-504 mg/Kg
Ovejas	800 mg/Kg.

Tabla 15. Dosis dérmica DL_{50} de Clorpirifos en diferentes especies de animales.

Especie	DL_{50}
Ratas	>2000 mg/Kg
Conejos	1000-2000 mg/Kg

Toxicidad crónica

Efectos reproductivos. El Clorpirifos no provoca efectos adversos en la reproducción.

Efectos teratogénicos. El Clorpirifos no es teratogénico.

Efectos mutagénicos. No hay evidencia que el Clorpirifos sea mutagénico.

Efectos carcinogénicos. No hay evidencia que el Clorpirifos sea carcinogénico.

Apéndice 2. Características de reactivos y equipos

Reactivos.

Acenafteno. $C_{12}H_{10}$. Peso Molecular 154.21g/mol, p.f. 95°, p.eb. 279°. Insoluble en agua, soluble en alcohol, metanol, propanol, cloroformo, benceno o tolueno.

Acetonitrilo; 99.93 %, grado HPLC (Aldrich). CH_3CN . Peso molecular 41.05 g/mol, p.f. - 45°, p.eb.81.6°. Miscible en agua, metanol, acetato de metilo, acetato de etilo, acetona, éter, acetamida, cloroformo, tetracloruro de carbono, cloruro de etilo y con hidrocarburos saturados (fracciones de petróleo).

Líquido y vapor flamable, por sobre exposición causa irritación en nariz, garganta, asfixia, náuseas, vómito, dolor de pecho, debilidad, aturdimiento y convulsiones.

1001 west Paul Avenue, Milwaukee w153233 USA (414) 2733850.

Ácido acético glacial (Baker analyzed) grado reactivo. CH_3COOH . Peso molecular 60.05 g/mol, p.f. 16.7°, p.eb. 118°. Miscible en agua, alcohol, glicerol, éter, tetracloruro de carbono. Prácticamente insoluble en disulfuro de carbono. Se ioniza débilmente en disoluciones acuosas; pKa 4.74. pH en disoluciones acuosas 1.0 M, 2.4; 0.1 M, 2.9; 0.01 M, 3.4. LD₅₀ oral en ratas 3.53 (g/Kg). Precaución. Causa quemaduras graves en la piel, la ingesta puede causar corrosión grave en boca y tracto gastrointestinal, con vómito, hematemesis, diarrea, colapso circulatorio, uremia y la muerte. Por exposición crónica puede causar erosión del esmalte dental, bronquitis, irritación de los ojos.

J.T. Baker, S.A. de C.V. Xalostoc, México.

Agua destilada.

Estándar de Clorpirifos, Lote: 048

Muestra comercial de Clorpirifos (Azol-Novel- Código de Producto: 1C210/CE Div. Intervet), fecha de elaboración 18/07/2003, Lote Piloto No. 015

Equipos y Material.

Columna cromatográfica Marca Waters[®], Part No. WAT04690, 3.9 X 150 mm, Symmetry[®] C18 5 μ m, Num. Serie W93261K 010, Made in Ireland.

Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia modular Marca Waters[®], bomba de alta presión modelo 510, inyector Rheodyne 725i, detector UV-Vis de longitud de onda variable modelo 484, integrador modelo 746.

Membrana Millipore tipo HVLP de 0.45 μ m para disolventes acuosos/orgánicos.

Potenciómetro pH 510 and Ion 510 Series (pH/mV/⁰C meter) with 110 V adaptation and electrode stand, Benchtop Meters, Marca OAKTON[®].

Sistema de filtración Millipore

Apéndice 3. Figuras

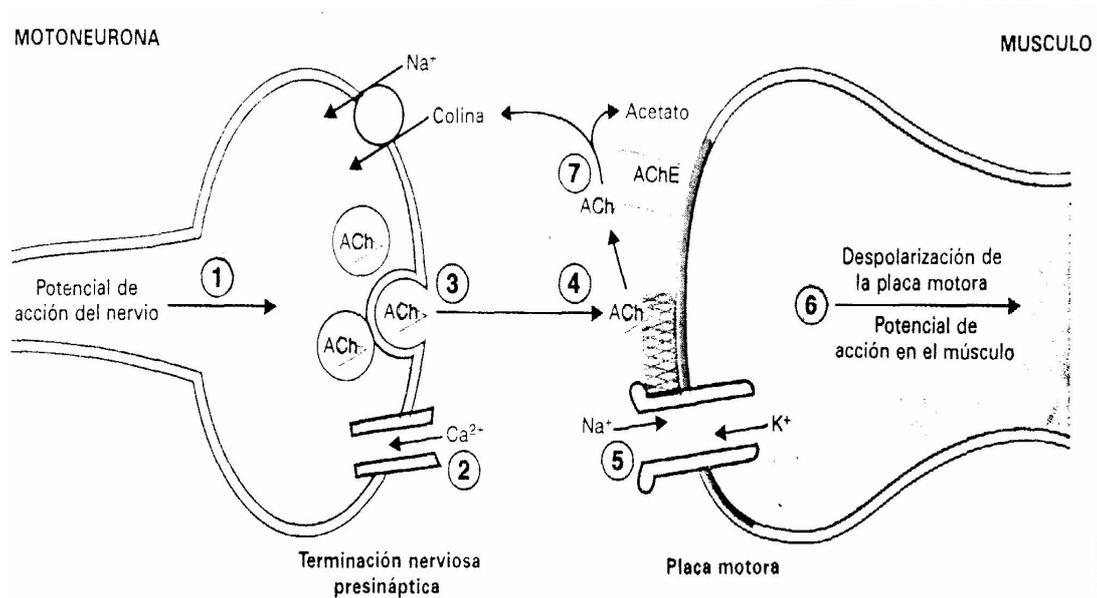


Figura 1. Esquema de una sinapsis química

1. Los potenciales de acción viajan a lo largo de la motoneurona hasta la terminal presináptica.
2. La despolarización de la terminal presináptica abre los canales de Ca^{2+} , y éste fluye hacia el interior de la terminal.
3. La acetilcolina (ACh) es liberada en la hendidura sináptica por exocitosis.
4. La ACh se une a su receptor sobre la placa motora.
5. Los canales de Na^+ y K^+ se abren en la placa motora.
6. La despolarización de la placa motora genera potenciales de acción en el tejido muscular adyacente.
7. La acetilcolina se desdobra en colina y acetato mediante la acetilcolinesterasa (AChE), la colina es captada de nueva cuenta hacia el interior de la terminal presináptica mediante un cotransportador de Na^+ -colina.

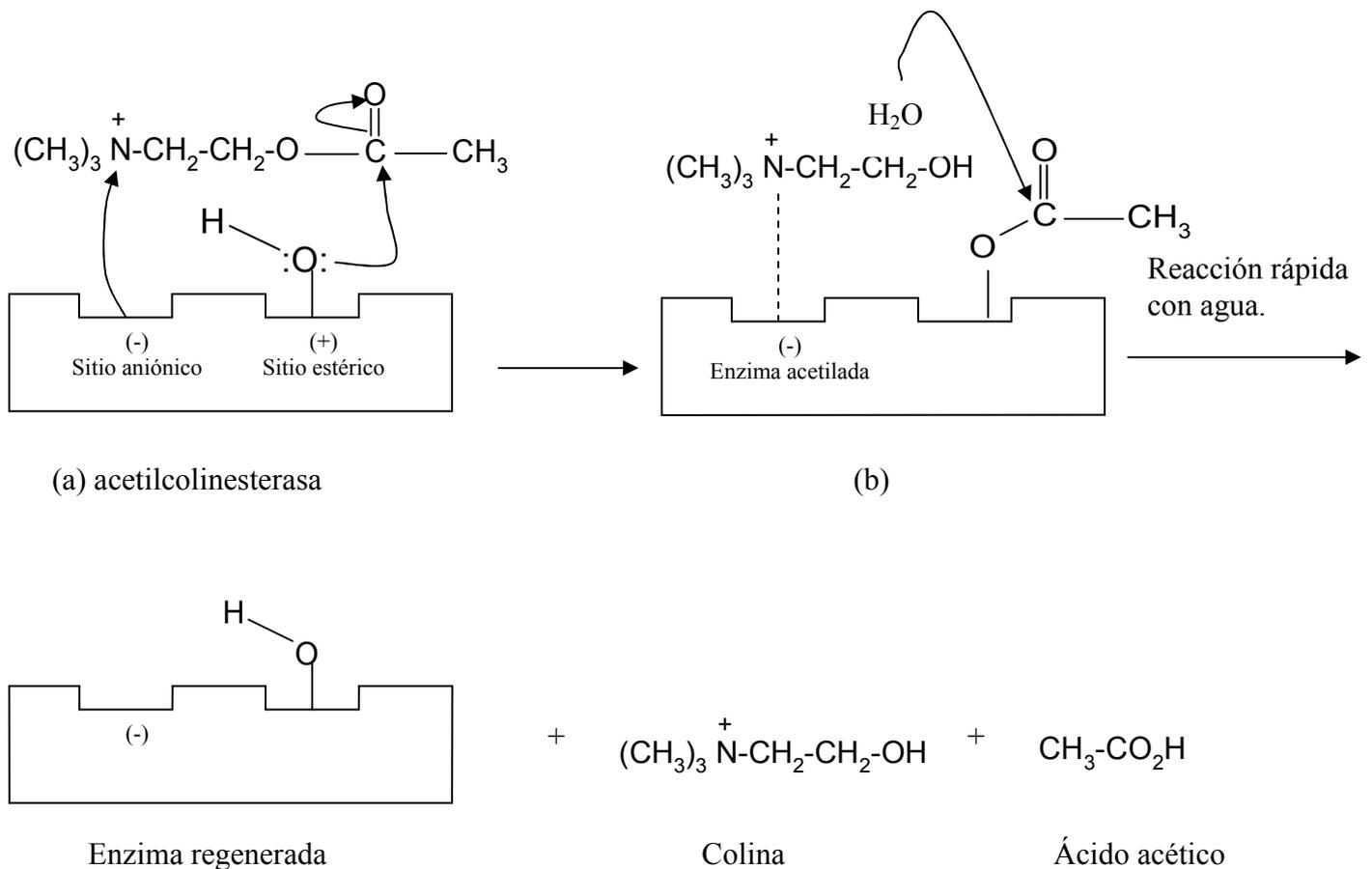


Figura 2. Formación del complejo enzima-sustrato

- Se forma el complejo enzima-sustrato por la orientación de los centros activos (aniónicos y estéricos) de la acetilcolinesterasa, que interaccionan con la acetilcolina.
- La enzima acetilada, se origina al interaccionar el sitio aniónico y estérico de ésta con el ión amonio cargado positivamente y el grupo carbonilo de la acetilcolina, posteriormente la enzima es hidrolizada rápidamente por la interacción de una molécula de agua en el sitio estérico, resultando la enzima libre, colina y ácido acético.

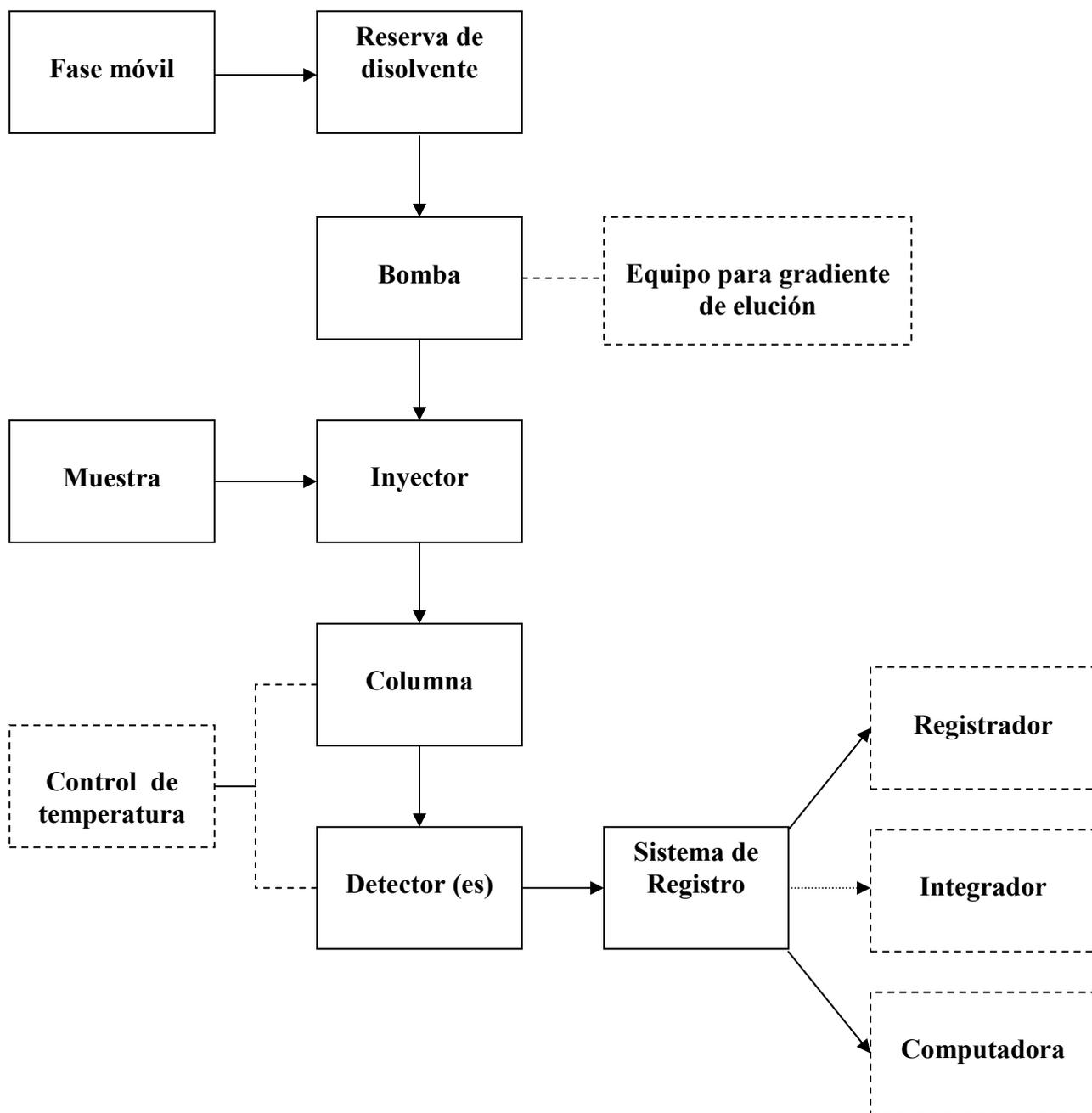


Figura 4. Esquema básico de un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE).

Apéndice 4. Fórmulas de parámetros cromatográficos

Número de platos teóricos (N). Representa el poder de separación de la columna, se calcula con las siguientes ecuaciones.

$$N = 16 \left(t_r / w_b \right)^2 = 5.545 \left(t_r / w_{1/2} \right)^2 \quad \text{..... Ecuación (5)}$$

Donde t_r , w_b o $w_{1/2}$ se deben expresar en las mismas unidades, por ser N “adimensional.”

- N = Número de platos teóricos
- t_r = Tiempo de retención (seg, min, h)
- w_b = Ancho de pico a la base (mm)
- $w_{1/2}$ = Ancho de pico medido a la mitad de la altura (mm)

Altura equivalente a un plato teórico (H). Segmento de la columna que representa a un plato teórico.

$$H = L / N \quad \text{..... Ecuación (6)}$$

Usualmente H se expresa en milímetros (mm).

L = Longitud de la columna (mm)

Factor de capacidad (k'). Es igual a la relación del tiempo que el soluto permanece en la fase estacionaria respecto al tiempo en fase móvil.

$$k' = t_r - t_0 / t_0 = t_r' / t_0 \quad \text{..... Ecuación (7)}$$

- t_r' = Tiempo de retención ajustado (seg, min)
- t_r = Tiempo de retención del soluto (seg, min)
- t_0 = Tiempo muerto (seg, min)

Apéndice 5. Cromatogramas

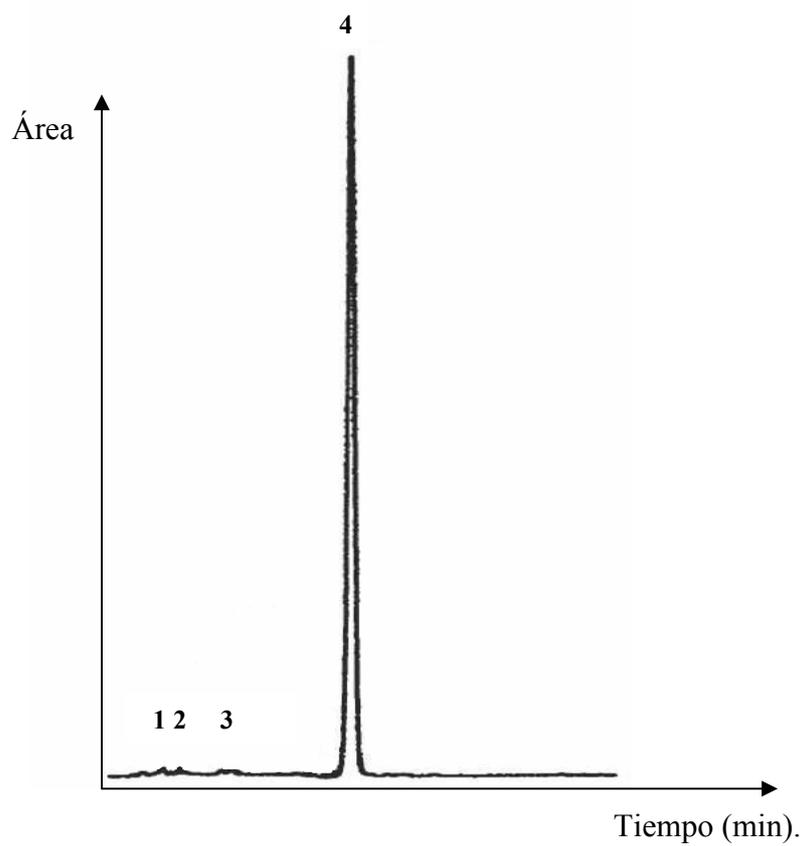


Figura 8. Estándar de Clorpirifos. Picos (1-3) impurezas del estándar, (4) Clorpirifos t_r = 4.90 min.

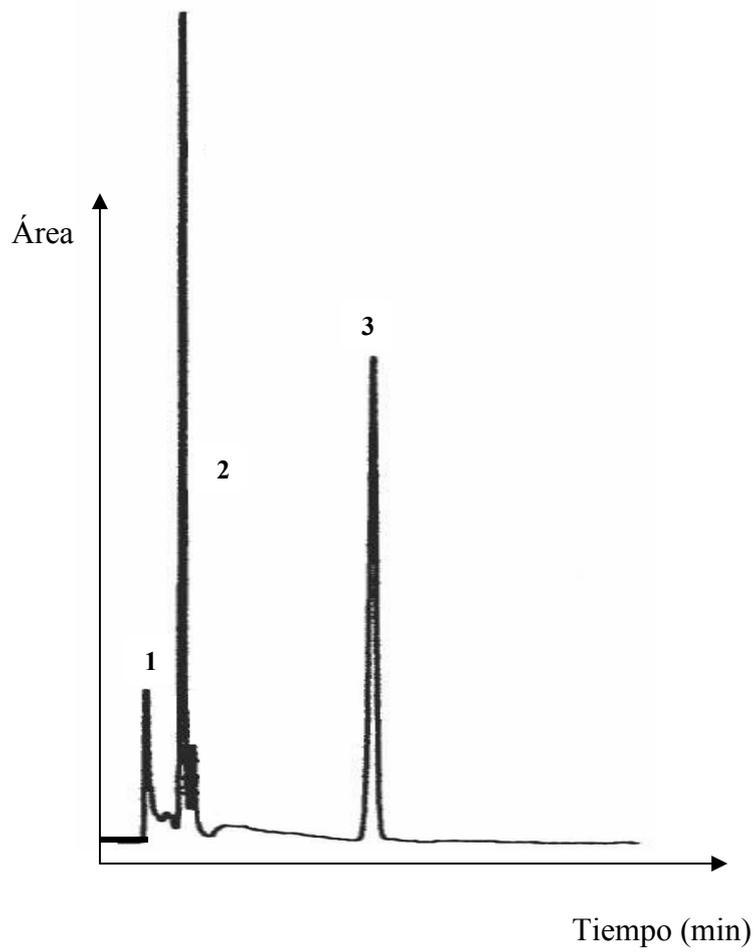


Figura 9. Clorpirifos en muestra de agua proveniente de baños de inmersión para ganado. Picos; (1) Disolvente, (2) impureza, (3) Clorpirifos $tr = 4.93$ min.

Apéndice 6. Glosario

Acetilcolinesterasa: enzima que regula la concentración de acetilcolina en las terminaciones posinápticas en la neurona, mediante una reacción de hidrólisis llevada a cabo en los enlaces éster del grupo carbonilo, para originar ácido acético y colina.

Altura equivalente a un plato teórico (H): Es la distancia entre dos unidades de equilibrio en una columna.

Anaplasmosis: Enfermedad infecciosa no contagiosa del ganado, que se caracteriza por anemia progresiva, fiebre eictericia y en ocasiones puede causar aborto y muerte de los animales, la cual es ocasionada por *Anaplasma marginale*, *rickettsia* que es transmitida por artrópodos como moscas, mosquitos, garrapatas, o bien por objetos contaminados como instrumental de cirugía y agujas.

Babesiosis: Enfermedad parasitaria del ganado bovino, causada por *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, transmitida por garrapatas del género *Boophilus* ssp., que afectan a los eritrocitos, se manifiesta por anemia, hemoglubinuria y fiebre.

Baño de inmersión: Conjunto de instalaciones donde se efectúa el tratamiento garrapaticida del ganado, consiste en un corral de acopio, manga, tina y escurridor. La tina corresponde al depósito en donde se encuentra el garrapaticida por donde se sumerge totalmente al ganado.

Cromatografía: Es una técnica analítica donde los componentes de una mezcla al ser separados, son distribuidos entre dos fases, una de las cuales es la estacionaria y la otra un fluido o fase móvil que pasa a través de la fase estacionaria.

Cromatograma: Es la representación gráfica obtenida del análisis cromatográfico de un soluto o mezcla.

Disolución “stock”: disolución concentrada de un estándar de la que se pueden hacer diluciones.

Estabilidad de la muestra : es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Factor de capacidad o de retención (k´): Es la relación de tiempo que permanece el soluto en la fase estacionaria y la fase móvil.

Fase estacionaria: Un sólido o un líquido que se distribuye uniformemente en un soporte o un tubo.

Fase móvil: Es un líquido, gas o fluido supercrítico que pasa a través de la fase estacionaria.

Límite de Cuantificación: Cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable.

Límite de Detección: Cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto.

Linealidad: Habilidad del método analítico para obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra.

Plaguicida: Cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destinan a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores de enfermedades humanas y de animales, así como las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal.

Plaguicida formulado: Mezcla de uno o más plaguicidas técnicos, con uno o más ingredientes conocidos como “inertes”, cuyo objetivo es dar estabilidad al ingrediente activo o hacerlo útil y eficaz, constituye la fórmula usual de aplicación de los plaguicidas.

Plaguicida industrial: Plaguicida técnico o formulado utilizado como materia prima en un proceso industrial para la elaboración de plaguicidas o productos de uso directo.

Plaguicida técnico: Es aquel que se encuentra en su máxima concentración de su ingrediente activo, junto con sus compuestos relacionados.

Plato teórico (N): Es el número de equilibrios que experimenta el soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

ppm: Cantidad de materia contenida en una parte sobre un total de un millón de partes. (mg/L)

Recobro: Es la evaluación mediante un estándar del procedimiento experimental, propuesto para el análisis de las muestras.

Resolución (R): Es la medida real del grado de separación de dos picos cromatográficos.

Selectividad (α): La afinidad que muestran los solutos por la fase estacionaria.

Soporte: Es un sólido poroso e inerte, que va dentro de una columna y sobre el cual se deposita la fase estacionaria.

Tiempo muerto (t_0): Es el tiempo requerido para que eluya un soluto no retenido en la fase estacionaria.

Tiempo de retención (t_r): Tiempo requerido para la elución del soluto de la columna.

Tiempo de retención ajustado (t'_r): Es el tiempo de retención menos el tiempo muerto. Es el tiempo real del soluto en la fase estacionaria.

BIBLIOGRAFÍA

1. CICLOPAFEST. (1994). Catálogo oficial de plaguicidas. Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas, SARH, Secretaria de desarrollo social, Secretaria de salud, SECOFI. México D. F.
2. Derache, R. (1990). Toxicología y seguridad de los alimentos. Barcelona España. Ed. Omega, 249, 263-264
3. NOM-019-ZOO-1994, Campaña nacional contra la garrapata *Boophilus ssp.* México.
4. NOM-045-SSA1-1993, Plaguicidas. Productos para uso agrícola, forestal, pecuario, de jardinería, urbano e industrial. Etiquetado. México.
5. Kamrin, A.M. (1997). Toxicity Enviromental Impact and Fate. Lewis Publisher, CRC. 148-151.
6. Morales, A.C. y Rodríguez, N. El clorpirifos: posible disruptor endocrino en bovinos de leche. *Rev. Col. Cienc. Pec.* **17** [3] (2004) 258
7. Cremlyn, R. (1989). Pesticide preparation and mode of action. London England. Ed. John Wiley & Sons, 77, 80-82
1. Eto, M. (1976). Organophosphorus Pesticides: Organic and Biological Chemistry. United States American. Second, Priting CRC. 78, 97-99, 248
2. Wayland, J.H. Jr. and Edward, R. L. Jr. (1999). Handbook of Pesticide Toxicology Vol. 2 Classes of Pesticides. Printed in the United States of American. Academic Press, Inc., 1065-1066
10. Shibamoto, T. F. (1996). Introducción a la toxicología de los alimentos. Zaragoza España. Ed. Acriba, 34-40
11. Schafer .Estudio de Toxicidad, *Appl. Pharmacol.* **21**(1972) 315
12. Abu-Qare, A.W. and Abou-Donia, M.B. Quantification of nicotine, chlorpyrifos and their metabolites in rat plasma and urine using high performance liquid chromatography. *J. of Chromatography B* **757** (2001) 295-300
13. Abu-Qare, A.W. and Abou-Donia, M.B. Determination of Diazinon, Chlorpyrifos, and their metabolites in rat plasma and urine by high performance liquid chromatography. *J. of Chromatography Science* **39** (2001) 200-203
14. Smith, N.G., Watson, S.B. and Fisher, S.F. Investigations on Dursban. Insecticide Metabolism of [³⁶Cl] O,O-Diethyl O-3,5,6-Trichloro-2-pyridyl Phosphorothioate in Rats. *J. Agr. Food. Chem.* **15** (1966) 132-138

15. McNair, M.H. (1973). Cromatografía de líquidos de alta resolución. The General Secretarial of the Organization of American States. Washington, D.C.
16. Silvestre, A.A. (1996). Toxicología y seguridad de los alimentos. 2ª Ed. Buenos Aires, 202-206
17. The Pesticide Manual, a World Compendium (1987). Eighth Ed. Published by the British crop protection council, Printed in Great Britain by The Lavenham Press Limited Lavenham, Suffolk, 179-180
18. ATSDR (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY). (1997). Clorpirifos CAS # 2921-882. <http://www.atsdr.cdc.gov/es/>.
19. Márquez, de C.M.J. (1991). Probabilidad y Estadística Para Ciencias Químicas-Biológicas. Ed. McGraw-Hill Interamericana de México 558
20. The Merck Index. (2001). An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Thirteenth Edition. Published by Merck Research Laboratories Division of Merck & Co., Inc. White House Station, NJ.