

UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

**INVESTIGACION DE RESIDUOS DE THIMET FORATO
EN TUBERCULOS DE PAPA - VARIEDAD ALPHA**

T E S I S

que para obtener el título de

QUIMICO

PRESENTA

JUAN SANDOVAL JAIMES



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.

A mis padres con profundo respeto y cariño

Sr. Lic. Juan Sandoval y Calindo

Sra. Ma. Teresa Jaimes de Sandoval

quienes con su sacrificio y ejemplo me alentaron hasta el fin.

A mis Hermanos.

**A mi tío y padrino
Sr. Luciano Ordóñez.**

Doy gracias a :

Sr. Ing. Carlos O. Arredondo.
Jefe de los Laboratorios de Control de Calidad de
Cyanamid de México, S. A. de C. V. y a esta Compañía
por la ayuda y facilidades otorgadas en la presente
investigación.

Agradezco a:

Sr. Ing. Oscar Fuentes del Valle.
por su valiosa aportación científica.

Sr. Ing. Francisco Taboada.
por su colaboración en el desarrollo de
este tésis.

Sr. Ing. Miguel Angel Morales F.
por su desinteresada ayuda para la elaboración
de este trabajo.

Capítulo I

Introducción:

La papa en México, Datos Económicos.

Control de insectos en la papa.

Capítulo II

Pesticidas:

Esteres fosforados.

Insecticidas sistémicos.

Thimet Forato, Descripción, Propiedades, Usos, Metabolismo, Toxicidad, Precauciones de Higiene Industrial.

Capítulo III

Métodos Generales de Análisis de Esteres fosforados.

Generalidades.

Determinaciones de esterazas.

Capítulo IV

Parte Experimental.

Descripción del experimento en el campo.

Experimentación en el laboratorio.

Reactivos y Materiales.

Proceso de extracción.

Proceso de inhibición de colinesterasa.

Curva de calibración.

Comparación del método de extracción.

Capítulo V

Resultados y Conclusiones.

Capítulo VI

Bibliografía.

CAPITULO I

INTRODUCCION

1. La Papa en México.

La papa es uno de los integrantes fundamentales en la dieta cotidiana de las diversas clases sociales del pueblo mexicano, debido a su bajo costo y por el alto valor alimenticio derivado de su contenido de hidratos de carbono, materias proteícas y vitaminas.

Se estudiará en forma sucinta un aspecto de los problemas que encara la producción de este tubérculo, que consideramos de importancia por la tendencia ascendente de su consumo en México.

En la última década el consumo de la papa ha adquirido un vigoroso incremento y consecuentemente su producción, así lo demuestran las estadísticas correspondientes, de esta manera podemos apreciar que del año de 1951 al de 1961 la superficie de tierra laborable destinada a la producción de este tubérculo se ha incrementado en un 60% con un consecuente aumento en producción que corresponden a un 185% y su valor de producción que se ha cuadruplicado. (1)

Años	Superficie cosechada (Ha.)	Producción (Ton.)	Valor de la Producción (\$)
1951	30755	137 900	82,106,142
1955	35561	180 050	89,692,422
1961	49500	206 900	205,672,000

2. Control de insectos en la Papa.

Las plagas que inciden a la papa son numerosas y atacan la parte foliar, tallo, raíz y el tubérculo. El control se lleva a cabo con diversos agentes destructores de los organismos nocivos.

En el transcurso de los años se han usado una gran diversidad de estos agentes como: arsenicales, clorados, fosforados y más específicamente arseniato de calcio, D D T, paration, paration metílico, aldrin, malation, thimet forato, etc.

En la actualidad los insecticidas fosforados y en especial los de acción sistémica van cobrando auge sobre los otros, ya que por su modo de acción, permiten un mejor control de insectos y en especial de los insectos - chupadores que atacan este cultivo.

La efectividad de los agentes químicos en el control puede depender de diversos factores como son: dosificación, composición del suelo, estabilidad, habilidad de la planta para absorberlo, temperatura ambiental, plaga que se combate, etc.

El presente trabajo está encaminado a la investigación por métodos químicos de extracción y microanálisis de residuos tóxicos en papa cuando se usó un insecticida sistémico, el thimet forato, compuesto, órgano fosforado de acción prolongada que es uno de los que permanece

mayor tiempo en el suelo y por lo tanto en la planta misma, esta investigación es parte de un experimento que se llevó a cabo en la región de Naviada, N. L. y que consistió en - la aplicación de thimet forato en forma líquida y granular a un cultivo de papa bajo diversas formas de aplicación y dosificación. Dicha labor la llevaron a cabo un grupo de Investigadores y Técnicos de Cyanamid de México, S. A., y de la Escuela Superior de Agricultura " Antonio Narro " de Saltillo, Coah.

Dicho experimento se ha encaminado primordialmente a dos fines que son a saber:

1. Determinar si el uso de thimet forato en papa variedad alba puede dejar un residuo de metabolito tóxico y por lo tanto nocivo para el consumo humano.

2. Obaervar el control de insectos chupadores - que atacan a este cultivo.

CAPITULO II

Pesticidas.

En la actualidad las sales orgánicas de los ácidos cuyo núcleo son átomos de fósforo pentavalente van cobrando auge debido a sus propiedades insecticidas, entre dichos ácidos podemos citar el ácido fosfórico, ácido tiofosfórico, ácido ditiofosfórico; de estos se derivan tóxicos que poseen un modo de acción común y que es el inhibir en mayor o menor grado la colinesterasa, este tema se tratará posteriormente por tener gran importancia ya que afecta directamente al hombre; a continuación enunciamos algunos compuestos derivados de los ácidos arriba mencionados:

Acido Fosfórico.	Acido Tiofosfórico.	Acido Ditiofosfórico.
Tepp	Paration	Thimet Forate
Posdrin	Systox	Thrition
Pyrazoxon	E P N	Nialato
D D V P	Diazinon	Gusation
Dipterex	Dicaption	Malatior

Algunos de estos insecticidas tienen la característica de ser sistémicos o sea que se absorben a través de la raíz, tallo y hojas de las plantas en las que se aplican, transportándose por el sistema vascular a diversas partes de la planta, haciéndolas tóxicas a los insectos que se alimentan de ella.

Ripper (7), ha clasificado los insecticidas sistémicos en tres grupos de acuerdo con su estabilidad y que son:

Estables. No sufren cambio alguno en la planta, como ilustración de este tipo citaremos al seleniuro de sodio y al fluoroacetato de sodio.

Endolíticos. Son aquellos que al ser adsorbidos no sufren variación en su composición, sino hasta después de cierto tiempo de evolución, convirtiéndose en compuestos inofensivos como ejemplo tenemos el sharadan.

Endometatósicos. Este tipo de insecticidas se caracterizan porque al ser adsorbidos son transformados o metabolizados en otros tóxicos más activos para después transformarse en productos inocuos.

Thimet Forato

El thimet forato es un éster del ácido ditioposfórico que posee las propiedades propias de los compuestos órgano-fosforados e insecticidas sistémicos del tipo endometatósicos arriba mencionados.

Las principales características físico-químicas de dicho compuesto son:

Nombre químico: Ditioposfato de O,O dietilo y S (etiltio metilo).

Nombre genérico: Forato.

Fórmula estructural:
$$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5 - \text{O} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \text{P} \\ \quad \quad \quad \diagup \\ \text{C}_2\text{H}_5 - \text{O} \end{array} \begin{array}{c} \text{S} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \text{S} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$$

Fórmula empírica: $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{O}_2\text{PS}_3$

Punto de ebullición: $110^\circ - 120^\circ \text{ C a } 0.8 \text{ mm Hg.}$

No. 6

Indice de Refracción (Grado técnico) n_D^{25} 1.5349.

Densidad de vapor 0.0106 g/l a 120° C y 1 mm de presión.

Densidad relativa 1.167 a 25° C.

Solubilidad. Baja solubilidad en agua (50 ppm aproximadamente). Miscible con cetonas, etanol, éter etílico, diésel, éter de petróleo, metil colozolve.

Miscible también con Xileno, Velmicol A_F 50-60

Aceite shell E 407, tetracloruro de carbono y aceites vegetales.

Estabilidad. Almacenado a temperatura ambiente se ha mostrado que es estable por un año al abrigo de la luz.

A pH alcalinos se hidroliza.

Es estable en carbón neutro, diatomeas ácidas marinas.

Acción corrosiva. Al contacto de hierro se puede formar un sedimento por lo que el thimet grado técnico (de 90%) y sus formulaciones líquidas se deben envasar en recipientes de vidrio o recipientes metálicos recubiertos interiormente con barnices o resinas.

Presentación del Producto.

El thimet forato se formula en las siguientes dosificaciones.

Thimet LC 8 (Líquido emulsificable al 83.05 peso).

Thimet 44 - D (Adsorbido en carbón activado al 44%)

Thimet 10% Granular (Adsorbido en arena o atapulgita)

USOS. La formulación líquida (83%) se emplea por medio de aspersión en el tratamiento de semillas y cultivos.

La formulación en polvo (44%) se emplea para el tratamiento de semillas de algodón.

La formulación granular se aplica esparciéndola sobre los surcos o bien a los costados de los cultivos.

El thimet forato se ha empleado para combatir plagas como trips, áfidos, ácaros en cultivos de alfalfa, frijol, algodón, uva, papa, fresa, melón, trigo y otros más.

Metabolismo.

El thimet forato pertenece al grupo de insecticidas órgano-fosforados sistémicos y específicamente a los tóxicos endometatóxicos, como se explicó anteriormente, - por esta razón al ser absorbido y posteriormente transportado a diversas partes de la planta se convierte por oxidación en otros metabolitos que son tóxicos secundarios y en este caso son más activos como inhibidores de colinesterasa que el mismo thimet forato inicial.

Esta transformación se ha comprobado extrayendo thimet y sus metabolitos de tejidos vegetales a intervalos de terminados después de haber sido aplicado y comparándolo con el producto sintético.

También se ha oxidado thimet in - vitro con agua de bromo, ácido peracético y N - B_r succinimida y se ha mostrado que el thimet al ser absorbido y metabolizado - por las plantas se oxida en las ligaduras del tio - éter y en los átomos de azufre unidos al núcleo de fósforo. (2)

Observando el proceso de oxidación que se lleva a cabo en la planta podemos establecer los siguientes productos de reacción:

Toxicidad.

El thimet forato posee propiedades toxicológicas que residen en su capacidad para inhibir la enzima llamada colinesterasa que hidroliza la acetilcolina liberada por los impulsos del sistema nervioso.

A continuación se muestran las pruebas biológicas efectuadas por la American Cyanamid Co. (5) a fin de manifestar la toxicidad del producto en animales.

La dosis letal 50% (DL_{50}) por vía oral se determinó disolviendo thimet en aceite de maíz y se administró por medio de sonda gástrica a ratas albinas de 90 a 120 g. de peso corporal. La concentración del aceite de maíz era tal que el volumen total de la dosis administrada en cada caso fue de 20 ml/Kg.

DL_{50} Oral machos estirpe CFH = 3.7 mg/Kg.

DL_{50} Oral hembras estirpe CFH = 1.8 mg/Kg.

La dosis letal 50% por contacto cutáneo se determinó aplicando thimet en forma de propilen glicol (1 ml = 20 mg) a ratas albinas machos estirpe CFH en una zona de piel rasurada a cada lado de la línea media dorsal; la DL_{50} calculada de acuerdo a los ensayos efectuados fue de 6 mg/Kg aproximadamente.

Precauciones de Higiene Industrial para el manejo de thimet forato.

Cuando el thimet forato se maneja en almacenes deberá operarse con un sistema adecuado de ventilación de aire.

Durante su aplicación no se debe aspirar la niebla o vapor de la aspersión, esto se puede lograr mediante el uso de una mascarilla apropiada para dicho fin.

Debe evitarse el contacto del producto con los ojos y piel mediante el uso de anteojos y ropa protectora (overol) e prueba de agua, esta deberá lavarse constantemente. Se deberá usar también guantes, botas de hule y cachucha.

En los centros de trabajo en que se maneje este producto deberán tener instalaciones sanitarias, como lavabos y baños de regadera con el fin de que los operarios se bañen y se cambien toda la ropa al terminar la jornada.

En caso de contacto cutáneo, con el producto, quite se la ropa contaminada y lávese, con agua y jabón. Asimismo los operarios deberán lavarse las manos con agua caliente y jabón antes de ingerir los alimentos o fumar.

No se debes ingerir o almacenar alimentos dentro del área donde se maneja thimet forate.

En caso de envenenamiento por ingestión por el producto, aléjese al operario del área de trabajo, llámese un médico, provóquese el vómito con agua salada o agua caliente jabonosa y suminístrele dos tabletas de atropina (100 mg c/u).

Si el envenenamiento es por contacto, aléjese al operario del área de trabajo, quitele las ropas contaminadas y lávese la piel con suficiente agua y jabón para eliminar cualquier traza del producto y suminístrense dos tabletas

de atropias (100 ag c/u).

La exposición continua a los inhibidores de colinesterasa puede causar susceptibilidad prolongada por lo que no se debe someter a un enfermo a nuevas exposiciones del producto, hasta que la colinesterasa haya vuelto a su nivel normal de acuerdo con los resultados de las pruebas de sangre.

CAPITULO III

Métodos Generales de análisis de Esteres Fosforados

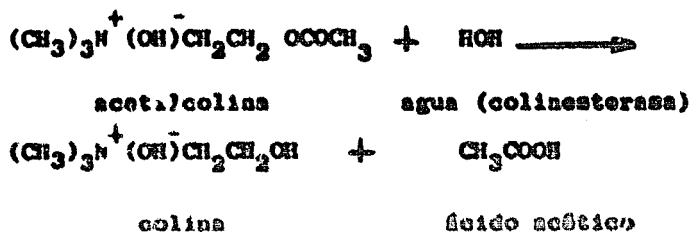
Generalidades

Hasta el presente se han desarrollado diversas técnicas de extracción, separación y evaluación de los esteres fosforados y sus metabolitos después de haberse transformado en los cultivos sobre los que se han aplicado. Dentro de estas técnicas podemos citar las siguientes: extracción por medio de solventes para un cuanteo posterior por cromatografía ya sea en papel o en columna. Determinaciones por espectroscopia ya sea en el rango de rayos ultravioletas, o en los infrarrojos. Mediciones del índice de refracción y determinaciones de esterases.

Determinaciones de Esterases.

Sobre estas determinaciones se hará un breve resumen bioquímico, ya que una de ellas ha servido para el dearrollo del presente trabajo, éstas se basan en dos principios que son:

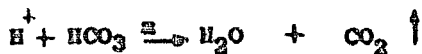
a) El cuanteo de la producción de ácido producido cuando un sustrato de acetilcolina es hidrolizado por una enzima como la colinesterasa, y esto de acuerdo con la siguiente reacción química.



5) La medición espectrofotométrica de la aparición de los productos de reacción (ácido y colina) o desaparición del sustrato de acetilcolina.

A continuación se enumeran tres técnicas basadas en el cuanteo por producción de ácido.

1) Método Manométrico. La acetilcolina al ser hidrolizada por acción enzimática de la colinesterasa en un sistema en el que se encuentra presente bicarbonato, produce la descomposición de ácido acético formando anhídrido carbónico, el cual se mide en el aparato de Warburg. La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



Este método es muy exacto, pero difícil de aplicar en la rutina, mas bien se considera una prueba de investigación.

2) Método Colorimétrico. En este caso la acetilcolina remanente de la reacción de hidrólisis, reacciona con hidroxilamina para formar ácido acetilhidroxámico, este al reaccionar con cloruro férrico forma un compuesto colorido que se cuantea en el espectrofotómetro.

1) Debido a las características del mismo se pueden analizar varias muestras a la vez.

2) Su exactitud es satisfactoria para el fin perseguido o sea, el detectar químicamente una cantidad de metabolitos de thimet forato suficiente para ser tóxicos al consumo humano.

3) La analogía entre la acción tóxica de los insecticidas organofosforados en el hombre y la base científica del desarrollo del método.

PARTE EXPERIMENTAL

Descripción del experimento en el campo.

El sitio donde se efectuó este experimento fué el lote 23 de Navidad, N. L. La simiente empleada fué cosechada en Noviembre de 1931 en León, Gto., y fué sembrada el 4 de Mayo de 1932 siendo cosechado el cultivo experimental el 26 de Septiembre de 1932.

Los objetivos perseguidos en el experimento fueron: la investigación de residuos tóxicos y el control de insectos chupadores que atacan a la papa.

Las plagas en cuestión son:

- a) Chicharrita de la papa. (Empoasca sp.)
- b) Peilido de la papa. (Paratricosa cockerelli)
- c) Mosquita blanca. (Aleyrodes sp.)
- d) Pulgas de las plantas. (Epitrix cucumeris)
- e) Miridos. (Mirido)
- f) Cicadélidos. (Cicadélido)

La siembra de papa se efectuó con los tratamientos - cuyas formas de aplicación y dosificación se detallan:

Tratamientos	1a. Aplicación	2a. Aplicación	Aplicación de la
	Dosis por Ha. Ingrediente Activo.	Dosis por Ha. Ingrediente Activo.	2a. Dosis, días - siembra.
1 Testigo	- -	- -	
2 Thimet.	2 Kg (G')	- -	
3 Thimet.	1 Kg (G')	1 Kg. (G')	66
4 Thimet.	1 Kg (G')	1 Kg. (LCS'')	90
5 Thimet.	2 Kg (G')	1 Kg. (G')	66
6 Thimet.	2 Kg (G')	1 Kg. (LCS'')	90
7 Thimet.	3 Kg (G')	- -	
8 Nemico.	2 Kg (G')	- -	

Thimet Granular al 10%.

Thimet LCS Liquido emulsificable al 83%.

En el lote experimental se sembró papa variedad alpa de tamaño 43 - 53 mm, se usó el sistema "diseño de bloques al azar" compuesto de 8 tratamientos; el terreno fué dividido en cuatro partes con el fin de obtener cuatro repeticiones de los 8 tratamientos. Cada tratamiento constó de parcelas de cuatro surcos de 100 m. de largo y con distancia de 82 cm. entre los surcos habiendo una separación entre plantas de 20 a 25 cms.

En el momento de la siembra se aplicó fertilizante en las cantidades por Ha. que se citan a continuación: 100 Kg. de N, 200 Kg. de P_2O_5 y 100 Kg. de K adicionando 6 Kg. de aldrín 25%.

Las aplicaciones de thimet granular al 10% se efectuaron con una máquina especial marca " Noble " adaptada a la sembradora de papa. Las aplicaciones de thimet LCS se efectuaron con una espersora marca " Hudson "

Las muestras obtenidas del lote experimental son representativas de cada una de las cuatro repeticiones de los ocho tratamientos para sumar un total de 32 muestras. Cada muestra se analizó una vez, cuando los resultados de algunas de ellas no concordaron con los obtenidos en las otras repeticiones del mismo tratamiento, se analizó por segunda vez con el fin de comprobación, cuando aún así difirieron los resultados del primer y segundo análisis se efectuó un tercero; en ambos casos se tomaron promedios.

Experimentación en el Laboratorio.**Reactivos.****1. Cloroformo Q.P**

2. Colinesterasa. Esta enzima se trató de obtener de plasma sanguíneo centrifugando sangre humana, pero como el producto resultante se hemolizó (probablemente debido a su antigüedad), se recurrió al uso de plasma humano liofilizado, reconstituido con agua destilada con citrato de sodio al 0.5% libre de pirogenos.

3. Solución Amortiguadora. Se disuelven 3.71 g. de barbital ácido, 44.7 g. de cloruro de potasio y 0.545 g. de fosfato dibásico de potasio en 450 ml. de agua destilada aproximadamente; se ajusta el pH de la solución a 8.1 con HCL 0.5N usando un potenciómetro; se pasa esta solución a un matraz volumétrico de 500 ml. de capacidad y se afora el volumen con agua destilada. Esta solución se debe renovar cada tres o cuatro semanas debido a que el pH y la capacidad amortiguadora de la mezcla decrecen durante su almacenamiento.

4.- Sustrato de Acetilcolina. Se disuelven 1.2 g. de cloruro de acetilcolina en 25 ml. de agua destilada. La solución debe renovarse cada ocho o diez días.

5. NaOH O.IN.

6. Solución tipo de calibración (0.16 μ g/ml de Tiofosfato de O,O dietilo y S (otilsulfonil) metilo al 99.7%).

7. Hexano, Q.P.**8. Benceno Q.P.****9. 1.2 Dicloroetano Q.P.**

Todos los reactivos deben guardarse refrigerados mientras estan fuera de uso.

Materiales.

1. Dos licuadoras equipadas con regulador de velocidad.
2. Una centrifuga con cuatro botellas de 250 ml. de capacidad.
3. Un potenciómetro Beckman modelo Zeronático equipado con electrodos pequeños para microanálisis.
4. Un cronómetro.
5. Un baño de temperatura constante.
6. Dos agitadores magnéticos.
7. Vasos de precipitados de 5 ml. de capacidad.
8. Una gradilla para diez vasos de 5 ml.
9. Cristalería diversa como: pipetas de Mohr y volúmetricas de 1 ml. de capacidad en adelante; embudos: cónicos y de separación; vasos de precipitados; probetas; matraces: volúmetricos y de vacío.
10. Una balanza analítica.

Procedimiento de extracción.

Se toma una muestra representativa, por lo menos 8 papas; se lavan y secan con una toalla de papel, se cuartean y despreciando las partes conegrecidas se pesan 100 g., se pasan a una licuadora, se añaden 100 ml. de agua destilada y se maceran a velocidad moderada durante 10 minutos, se añaden 100 ml. de cloroformo Q.P. y se vuelve a macerar por 10 minutos adicionales; se pasa la muestra íntegra a dos botellas de

centrífuga de 250 ml. de capacidad y se opera durante 20 minutos a 2000 r.p.m.; transcurrida esta operación se extrae y desecha el extracto acuoso (superior) usando una trampa de vacío, se agita vigorosamente la pulpa remanente con una varilla de vidrio y añaden 50 ml. de agua destilada a cada una de las botellas se homogeniza y se centrifuga por 20 minutos más a 2000 r.p.m., posteriormente se sifonea y desecha el extracto acuoso (superior) usando la trampa de vacío y con una varilla de vidrio se perfora la pulpa cerca de las paredes de la botella, se filtra el extracto de cloroformo a través de un filtro de algodón en un embudo de separación de 250 ml. de capacidad; agitando la pulpa de las botellas de manera de extraer y obtener 50 ml. de cloroformo filtrado cuando menos; se añaden 75 ml. de agua destilada al embudo de separación y se lava cuidadosamente para no emulsionar el contenido, se sifonea y desecha el extracto acuoso y se repite el lavado en la misma forma; se extrae la capa de cloroformo filtrándolo a través de un filtro de algodón recogiendo en una probeta graduada de 100 ml. Se toma una alícuota de 35 ml. de cloroformo (equivalente a 1 Mg de Thimet) que posteriormente, debido a los resultados bajos obtenidos en el cálculo del % de inhibición de colinesterasa determinaron el usar la totalidad del filtrado de cloroformo; se pasan a un matraz de vacío de 125 ml. de capacidad.

Nota. En este paso el procedimiento de extracción se detuvo el proceso debido al factor tiempo; se tapó la boca y el brazo del matraz y se guardó en el refrigerador.

A continuación se esbozan los resultados obtenidos de

las muestras analizadas, durante el proceso de extracción; su identificación se ilustra con el siguiente ejemplo: T6R11; T6 significa tratamiento No. 6 (Aplicación de Thimet granular al 10% en el momento de la siembra en una dosificación de 2 Kg/Ha. de ingrediente activo); R11 significa repetición o muestra obtenida en la segunda parte de una de las cuatro en que fué dividido el lote experimental.

Número de Análisis.	Muestra	H2O añadido (ml)	CHCl3 añadido (ml)	Peso de muestra tomado (g)	Alicuota de CHCl3 obtenida (ml).
1	T6R11	100	100	100.0034	62
2	T4R11	100	100	100.0056	62
3	T6R11	100	100	100.0008	64
4	T5R11	100	100	100.0062	65
5	T4R1	100	100	100.0283	58
6	T1R111	100	100	100.0205	54
7	T4R111	100	100	100.0207	55
8	T5R111	100	100	100.0450	61
9	T3R11	100	100	100.0699	58
10	T6R111	100	100	100.1115	50
11	T5R1	100	100	100.0018	62
12	T2R1	100	100	100.0023	59
13	T3R111	100	100	100.0020	59
14	T1R11	100	100	100.0105	59
15	T2R11	100	100	100.0000	55
16	T8R11	100	100	100.0023	58
17	T8R111	100	100	100.0107	58
18	T7R111	100	100	100.0123	61
19	T2R111	100	100	100.0057	60
20	T7R11	100	100	100.0134	60
21	T1R1	100	100	100.0036	60
22	T3R111	100	100	100.0102	64
23	T7R1	100	100	100.0116	61
24	T8R1	100	100	100.0002	64
25	T2R1	100	100	100.0189	63
26	T3R11	100	100	100.0404	62
27	T1R111	100	100	100.0265	57
28	T5R1	100	100	100.0100	65
29	T4R1V	100	100	100.0103	61
30	T1R1V	100	100	100.0228	57
31	T5R1V	100	100	100.0003	64
32	T2R1V	100	100	100.0360	65
33	T6R1V	100	100	100.0319	65
34	T7R1V	100	100	100.0174	47

Número de Análisis	Muestra	H ₂ O añadido (ml)	ClCl ₃ añadido (ml)	Peso de muestra tomado (g)	Alcuzeta de ClCl ₃ obtenida (ml).
35	T3RIV	100	100	100.0011	63
36	T3RIV	100	100	100.0077	61
37	T1R1	100	100	100.0384	63
38	T1R11	100	100	100.0131	63
39	T1RIV	100	100	100.0000	64
40	T3RIV	100	100	100.0239	65
41	T1R11	100	100	100.0036	61
42	T3R111	100	100	100.0035	65
43	T3R11	100	100	100.0182	63
44	T2R11	100	100	100.0382	60

Continuación del procedimiento de extracción.

Se añaden 10 ml. de agua destilada al matraz que contiene la alícuota de cloroformo, se conecta a la línea de vacío, se introduce una "masca" y con ayuda del agitador magnético se evapora el cloroformo.

Durante este proceso de evaporación al vacío se forma una capa de hielo, la cual debe mantenerse fundida sumergiendo continuamente al matraz en agua caliente.

Se evapora completamente el cloroformo, esto debido a que dicho solvente es un poderoso inhibidor de colinesterasa (3), que falsificaría los resultados.

La evaporación del cloroformo se logra cuando han desaparecido las burbujas que se forman en torno al residuo de consistencia de cera remanente de la operación; y para asegurar la ausencia del solvente se continúa evaporando por 10 minutos más. Se filtra la solución a través de un pedacito de algodón ajustado en un embudo cónico y se recoge en un matraz volumétrico de 80 ml; se enjuaga con 5 ml. de agua destilada el matraz de vacío usado durante la evaporación y se recoge el filtrado a través del mismo algodón en el matraz volumétrico; se añaden 10 ml. de cloroformo al matraz de vacío usando el filtro de algodón de la operación anterior, se enjuagan las paredes de dicho matraz y se vuelven a repetir los mismos pasos desde la evaporación al vacío del cloroformo.

Los filtrados obtenidos en el matraz volumétrico de 80 ml. no deben exceder de 40 ml.

Dadas las características tanto del método, como de

reactivos y equipo usados, es conveniente efectuar el análisis en series de 8 o 9 muestras, a la vez. En el caso presente - las series consistieron de 4 a 8 muestras y un blanco, en algunas series se corrió un segundo blanco con el fin de comprobación en los cálculos del tiempo total de inhibición de colinesterasa.

Procedo de inhibición de colinesterasa.

Se reconstituye el plasma humano liofilizado con el solvente adjunto, y se procede a preparar un blanco con 45 ml. de agua destilada en un matraz volumétrico de 50 ml., del plasma reconstituido, se pipetea cuidadosamente 5 ml. para evitar la formación de espuma, se añade una gota de NaOH 0.1N, se agita vigorosamente durante 30 segundos aproximadamente, se introduce en el baño de temperatura constante a 37.5°C y se inicia el funcionamiento de un cronómetro en 0 minutos.

En la misma forma se procede a preparar las 8 o 9 soluciones muestras provenientes de la extracción, o bien el segundo blanco introduciéndolas en el baño a intervalos de dos minutos exactas cada muestra.

Transcurridos 60 minutos se toma el blanco (1er muestra) se agita y se introduce otra vez en el baño y así sucesivamente con las demás muestras.

Después de un tiempo total de 70 minutos se toma el blanco del baño y se transfiere una alícuota de un ml. a un vaso de precipitados de 5 ml. de capacidad, se añade 1 ml. de la solución amortiguadora y se pone en la gradilla que está sumergida en el baño de temperatura constante a 37.5°C ; durante esta operación deben transcurrir dos minutos; en la misma forma se toman las demás muestras espaciándolas a intervalos de dos

minutos cada una.

Transcurridos 90 minutos se toma el blanco, se determina y registra el pH usando un potenciómetro previamente calibrado con una solución amortiguadora tipo a pH 7.0 a temperatura ambiente y el control de temperatura puesto a -33°C (3). Se añade 0.3 ml. del sustrato de acetilcolina - usando una pipeta de Mohr, se agita ligeramente y se regresa al baño de temperatura constante dos minutos después de haberlo tomado del agua; en la misma forma se procede con las demás muestras, espaciándolas a intervalos de dos minutos.

Transcurridos 60 minutos adicionales (150 en total desde el principio del proceso de incubación), se toma el blanco y se determina y registra el pH así también se registra el tiempo exacto y se calcula el tiempo total de incubación requerido para disminuir el pH hasta cerca de 6.0; dicho cálculo se lleva a cabo de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{\Delta t}{\Delta \text{pH}} \times \Delta \text{pHt} = \text{tiempo total requerido.}$$

Donde ΔpH es el cambio en pH (pH inicial - pH - después de 60 minutos).

Δt es el tiempo transcurrido en minutos (60) desde que el primer pH fué tomado (90 min.) hasta el segundo pH (150 min.); ΔpHt es el cambio requerido desde el primer pH hasta pH 6.0

Ejemplo numérico. Cálculo del tiempo total requerido de la 1a. serie de muestras.

	pH a 39° C a las		
	90 Min.	150 Min.	210 Min.
blanco.	8.15	7.1	6.0

$$\frac{\Delta t}{\Delta \text{pH}} \times \Delta \text{pH} = \text{tiempo total requerido.}$$

$$\Delta t = 60 \text{ minutos.}$$

$$\Delta \text{pH} = 8.15 - 7.1 = 1.05$$

$$\Delta \text{pH} = 8.15 - 6.0 = 2.15$$

Sustituyendo valores

$$\frac{60}{1.05} \times 2.15 = 123.7 \approx 123 \text{ minutos.}$$

De donde se deduce que los 60 + 123 = 213 minutos es el intervalo total de incubación en esta serie.

En la misma forma se lleva a cabo el cálculo en las demás series de análisis.

Al final del tiempo requerido para que el pH disminuya a 6.0 se determina el pH final de todas las muestras.

Cálculos.

El % de inhibición de una solución muestra se calcula comparando el cambio de pH (ΔpH) entre el blanco y la muestra tratada de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\Delta \text{pH})_B - (\Delta \text{pH})_M}{(\Delta \text{pH})_B} \times 100$$

donde $(\Delta \text{pH})_B$ es el cambio de pH del blanco (pH inicial menos pH final).

$(\Delta \text{pH})_M$ es el cambio de pH de la muestra tratada - (pH inicial menos pH final).

El % de inhibición de una solución muestra corresponde a una determinada cantidad del último metabolito activo (Tiofosfato de O,O dietilo y S (etil-sulfonil) metilo) en que se transforma el Triacet ferato, durante su metabolismo en las plantas; esta relación se obtiene mediante la curva de calibración la cual se elabora usando diversas cantidades de dicho metabolito.

Para evaluar el Tiofosfato de O,O dietilo y S (etil-sulfonil) metilo en ppm. en muestras de campo, se procede de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{v (a/b)}{c \times b} = \text{ppm Tiofosfato de O,O dietilo y S. (etil-sulfonil) metilo.}$$

Donde v son los microgramos del metabolito final encontrados en la muestra mediante la curva de calibración; a es el volumen (ml) de agua añadidos durante la maceración; b es el volumen (ml) de la alícuota de cloroformo obtenida y usada en el análisis; c es el peso (g) de la muestra.

Cálculo del % de inhibición.

pH obtenido a 33° C

Muestra	90 Min.	150 Min.	210 Min.
Blanco	8.15	7.1	6.0
1 (TCR11)	8.15		6.35

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\Delta \text{pH})_B - (\Delta \text{pH})_H}{(\Delta \text{pH})_B} \times 100$$

$$(\Delta \text{pH})_B = 8.15 - 6.0 = 2.15$$

$$(\Delta \text{pH})_H = 8.15 - 6.35 = 1.80$$

$$\% = \frac{2.15 - 1.80}{2.15} \times 100 = \frac{0.35 \times 100}{2.15} = \frac{35}{2.15} = 16.27\%$$

La cantidad (v) de Tiofosfato de O,O dietilo y S (etilsulfonil) metilo correspondiente a este % se obtiene mediante la curva de calibración y es igual a 0.22 mcg/ 60 ml.

$$\text{ppm Tiofosfato de O,O dietilo y S (etilsulfonil) metilo} = \frac{v (a+b)}{c \times b}$$

$$a = 100 \text{ ml.}$$

$$b = 62 \text{ ml.}$$

$$c = 100.0034 \text{ g.}$$

$$\text{sustituyendo ppm} = \frac{0.22 (100+100)}{100 \times 62} = \frac{44}{6200} = 0.0071$$

En esta forma se obtuvieron los resultados de las series de muestras analizadas en el laboratorio, que a continuación se tabulan.

NOTA.- El peso de la muestra en todos los casos se redondea a 100.0 g con el fin de facilitar los cálculos.

1a. Serie.

No. de Análisis	Muestra	pH obtenido a 33° C y a intervalos de 90 150 213 Min.	Min.	Min.	ΔpH	ApH	% de inhibición celular.	μg de Compuesto en 50 ml.	Alícuota de 1/20 de Compuesto en 100 unidades.	Y.
Blanco	-	8.15	7.1	6.0	2.15	-	-	-	-	-
1	TERRI	8.15	-	8.35	-	1.80	16.27	0.22	62	0.0071
2	TERRI	8.10	-	6.40	-	1.70	20.03	0.255	62	0.0083
3	TERRI	8.15	-	6.40	-	1.75	16.60	0.215	64	0.0073
4	TERRI	8.15	-	6.20	-	1.95	9.3	0.172	65	0.0032

Para fines de simplificación de cálculo el peso de todas las muestras se considera constante e igual a 100.0 g.

Cálculo del tiempo total de incubación requerido en la 1a. Serie de muestras.

$$\frac{\Delta T}{\Delta pH} \times \Delta pH = \text{tiempo total}$$

$$\Delta T = 60 \text{ minutos.}$$

$$\Delta pH = 8.15 - 7.1 = 1.05$$

$$\Delta pH = 8.15 - 6.0 = 2.15$$

$$\frac{60}{1.05} \times 2.15 = 122.7 \approx 123 \text{ minutos} \quad \therefore 60 + 123 = 213 \text{ minutos.}$$

(Compuesto V') Tiocefato de 0,0 dietilo y 3 (otilmetilenoil) metilo.

2a. Serie.

No. de Análisis	Muestra	pH obtenido a 33° C y a intervalos de			Δ pHB	Δ pHM	% de inhibi- ción calcula- do.	M de Compuesto V' en 50 ml.	Aliquota de CHCl ₃ usado.	ppm. de Compuesto V'
		90 Min.	150 Min.	215 Min.						
Blanco	-	8.3	7.2	6.2	2.1	-	-	-	-	-
5	T4R1	8.2		6.35	-	1.85	11.9	0.192	56	0.0058
6	T1R111	8.25		6.5	-	1.75	16.6	0.23	54	0.0061
7	T4R111	8.3		6.57	-	1.73	17.6	0.23	55	0.0062
8	T5R111	8.35		6.45	-	1.9	9.5	0.175	61	0.0057
9	T3R11	8.3		6.6	-	1.7	19.0	0.24	58	0.0062
10	T6R111	8.3		6.57	-	1.73	17.6	0.23	59	0.0062
11	T4R1	8.3		6.5	-	1.8	14.3	0.205	62	0.0058
12	T2R1	8.3		6.10	-	1.8	11.9	0.19	59	0.0054

El peso de todas las muestras se considera constante e igual a 100.0 g.

Cálculo del tiempo total de incubación requerido en la 2a. Serie de Muestras.

$$\frac{\Delta T}{\Delta pHB} \times \Delta pHT = \text{tiempo total}$$

$$\begin{aligned} \Delta T &= 60 \text{ minutos.} \\ \Delta pHB &= 1.1 \\ \Delta pHT &= 2.3 \end{aligned}$$

$$\frac{60}{1.1} \times 2.3 = 125 \text{ minutos} \therefore 60 + 125 = 215 \text{ minutos.}$$

(Compuesto V') Tiofosfato de O,O dietilo y S (etilulfonil) metilo.

3a. Serie.

Muestra	pH obtenido a 33° C a intervalos de			Δ_{pH}	Δ_{pH}	% de inhibi- ción calcula- do.	mg de Compuesto V' en 50 ml.	Alícuota de células usada	ppm de Compuesto V'
	90 Min.	150 Min.	215 Min.						
-	8.3	7.2	6.1	2.2	-	-	-	-	-
T3R111	8.3		6.2	-	2.1	4.5	0.13	59	0.0044
T1R11	8.3		6.2	-	2.1	4.5	0.13	59	0.0044
T2R11	8.3		6.15	-	2.15	2.3	0.08	63	0.0039
T6R11	8.2		6.15	-	2.05	6.8	0.15	56	0.0051
T6R111	8.3		6.2	-	2.1	4.5	0.13	60	0.0046
T7R111	8.25		6.1	-	2.15	2.3	0.08	61	0.0038
T2R111	8.3		6.15	-	2.15	2.27	0.08	60	0.0036
T7R11	8.25		6.2	-	2.05	6.8	0.155	60	0.0051

peso de todas las muestras se considera constante e igual a 100.0 G.

culo del tiempo total de incubación requerido de la 3a. Serie.

$$\frac{\Delta T}{\Delta_{pH}} \times \Delta_{pHT} = \text{tiempo total}$$

$$\begin{aligned} \Delta T &= 60 \text{ minutos.} \\ \Delta_{pH} &= 1.1 \\ \Delta_{pHT} &= 2.3 \end{aligned}$$

$$\frac{60}{1.1} \times 2.3 = 126 \text{ minutos} \quad \therefore 60 + 126 = 186 \text{ minutos.}$$

Compuesto V') Tiofosfato de O,O dietilo y S (etilulfosil) metilo.

4a. Serie.

Muestra	pH obtenido a 33° C y a intervalos de Δp_{Ht}			Δp_{Ht}	% de inhibi- ción calcula do.	Mg de Compuesto V' en 50 ml.	Aliquota de células usada.	ppm de Compuesto V'
	90 Min.	150 Min.	200 Min.					
-	8.20	7.0	6.15	2.05	-	-	-	-
T1R1	8.20		6.35	- 1.85	9.7	0.177	60	0.0070
T3R111	8.20		6.55	- 1.65	19.6	0.243	60	0.0078
T7R1	8.25		6.35	- 1.90	7.3	0.16	61	0.0062
T8R1	8.25		6.30	- 1.95	4.9	0.13	64	0.0040
T2R1	8.25		6.45	- 1.80	12.4	0.19	63	0.0061
T3R11	8.25		6.45	- 2.0	2.44	0.08	62	0.0028
T1R111	8.25		6.40	- 1.85	9.77	0.175	67	0.0061
T5R1	8.20		6.60	- 1.60	21.9	0.26	65	0.0080
-	8.20	7.0	6.15	2.05	-	-	-	-

peso de todas las muestras se considera constante e igual a 100.0 g.

Intervalo del tiempo total de incubación requerido de la 4a. Serie.

$$\frac{\Delta T}{\Delta p_{Ht}} \times \Delta p_{Ht} = \text{tiempo total}$$

$$\begin{aligned} \Delta T &= 60 \text{ minutos.} \\ \Delta p_{Ht} &= 1.2 \\ \Delta p_{Ht} &= 2.2 \end{aligned}$$

$$\frac{60}{1.2} \times 2.2 = 110 \quad \therefore \quad 90+200 \text{ minutos.}$$

Compuesto V') tiofosfato de O,O dietilo y S (etilgulfonil) metilo.

Sa. Serie.

de lisis	Muestra	pH obtenido a 33° C y a intervalos de			ΔpH _B	ΔpH _M	% de inhibi- ción calcula do.	Ag. de Componento V' en 50 ml.	Alícuota de celo ₁₃ usada	ppm de Componento V'
		90 Min.	150 Min.	210 Min.						
	blanco	8.4	7.2	6.2	2.2	-	-	-	-	-
29	T4RIV	8.4		6.8	-	1.8	18.2	0.23	61	0.0055
30	T1RIV	8.37		6.4	-	1.97	10.2	0.18	67	0.0043
31	T5RIV	8.4		6.6	-	1.8	18.2	0.23	64	0.0073
32	T2RIV	8.4		6.5	-	1.9	13.6	0.20	65	0.0043
33	T6RIV	8.35		6.4	-	1.95	11.3	0.165	63	0.0047
34	T7RIV	8.4		6.35	-	2.05	6.8	0.16	47	0.0042
35	T3RIV	8.33		6.7	-	1.63	25.0	0.28	63	0.0059
36	T8RIV	8.37		6.3	-	1.67	14.7	0.21	61	0.0052

El peso de todas las muestras se considera constante e igual a 100.0 g.

Cálculo del tiempo total de incubación requerido de la Sa. Serie.

$$\frac{\Delta T}{\Delta pH} \times \Delta pH = \text{tiempo total}$$

$$\begin{aligned} \Delta T &= 60 \text{ minutos.} \\ \Delta pH &= 1.2 \\ \Delta pH &= 2.4 \end{aligned}$$

$$\frac{60}{1.2} \times 2.4 = 120 \text{ minutos} \quad \therefore \quad 90 + 120 = 210 \text{ minutos.}$$

(Componento V') Fosfato de O,O dietilo y S (etilulfonil) metilo.

6a. Serie.

de Ries Muestra	pH obtenido a 33° C y a intervalo de			Δ_{pH}	Δ_{pH}	% de inhibi- ción calcula do.	Ag. de Compuesto V' ca 80 ml.	Alícuota de ca 15 ueda	ppm de Compuesto V'	
	90 Min	150 Min	215 Min.							
6	-	8.4	7.15	8.4	2.0	-	-	-	-	
7	TIRI	8.4		8.7	-	1.7	15.0	0.21	88	0.0063
8	TIRIII	8.4		8.5	-	1.9	8.0	0.19	83	0.0041
9	TIRIV	8.33		8.7	-	1.65	17.5	0.29	84	0.0072
0	TORIV	8.33		8.83	-	1.78	11.2	0.184	85	0.0047
1	TIRII	8.33		8.43	-	1.93	3.7	0.110	81	0.0037
2	TORIII	8.35		8.83	-	1.83	8.8	0.167	86	0.0050
3	TORII	8.35		8.4	-	1.95	2.6	0.08	82	0.0027
4	TORII	8.35		8	-	1.85	2.5	0.08	80	0.0026

El peso de todas las muestras se considera constante e igual a 100.0 G.

Cálculo del tiempo total de incubación requerido en la 6a. Serie.

$$\frac{\Delta T}{\Delta_{pH}} \times \Delta_{pH} = \text{tiempo total}$$

$$\begin{aligned} \Delta T &= 60 \text{ minutos} \\ \Delta_{pH} &= 1.25 \\ \Delta_{pH} &= 2.4 \end{aligned}$$

$$\frac{60}{1.25} \times 2.4 = 115 \text{ minutos} \quad \therefore 60 + 115 = 215 \text{ minutos.}$$

(Compuesto V') Tiofosfato de O,O dietilo y S (etilsulfosil) metilo.

8
6
6

CURVA DE CALIBRACION

Se pesan 30 mg de solución tipo de calibración - (Tiofosfato de O,O - diotilo y S (etilsulfonil) metilo) en un penafiltro tarado, se disuelve en alcohol etílico al 95% y se pasa cuantitativamente a un matraz volumétrico de 250 ml., se afora al volumen con alcohol. Se transfiere una - alícuota de 2 ml. de esta solución a un matraz volumétrico de 1 lt., se afora al volumen con agua destilada y se homogeⁿiza. Un mililitro de esta solución contiene 0.16 Mg. - del standard de calibración, se transfieren alícuotas de - 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 1.75, 3.5, 4.5, 6.0, 8.0 ml. a matraces volumétricos de 50 ml. se diluyen con agua destilada y se procede en la misma forma descrita en el proceso de inhibi^ción exceptuando el añadir una gota de NaOH 0.1N.

Se calcula el % de inhibición correspondiente a cada alícuota y se grafica la curva en papel semilogarítmico - de 3 ciclos tabulando en la escala lineal el % de inhibición calculado, y en la escala logarítmica la concentración de la solución tipo standard de calibración expresada en Mg/50 ml.

No.	Alícuotas		pH registrado a 33° C			% de inhibición calculado.
	ml.	Mg	90 Min.	150 Min.	210 Min.	
1	blanco		8.6	7.3	6.4	-
2	0.2	0.032	8.6		6.4	0
3	0.5	0.080	8.6		6.45	3.27
4	0.8	0.128	8.6		6.5	4.54
5	1.0	0.16	8.6		6.55	6.91
6	1.75	0.28	8.6		6.65	25.0
7	3.5	0.56	8.6		7.6	54.5
8	4.5	0.72	8.6		7.8	63.6
9	6.0	0.96	8.55		8.0	75.0
10	8.0	1.28	8.55		8.1	79.5

Los cálculos son semejantes a los ya vistos anteriormente.

1.- Tiempo total de incubación.

$$\frac{\Delta T}{\Delta \text{pH}} \times \Delta \text{pHT} = \text{tiempo total de incubación requerido.}$$

$$\begin{aligned} \Delta T &= 60 \text{ Minutos.} \\ \Delta \text{pH} &= 8.6 - 7.3 = 1.3 \\ \Delta \text{pHT} &= 8.6 - 6.0 = 2.6 \end{aligned}$$

$$\frac{60}{1.3} \times 2.6 = 120 \text{ Minutos.}$$

de donde a los 90+120 = 210 Minutos se toma el pH final de toda la serie.

2.- Cálculo del % de inhibición de cada muestra. (Se lleva a cabo mediante la fórmula vista anteriormente)

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\Delta \text{pH})_B - (\Delta \text{pH})_E}{(\Delta \text{pH})_B} \times 100$$

Donde (ΔpH)B es el cambio en pH del banco (pH inicial menos pH final).

(ΔpH)M es el cambio en pH de la muestra tratada (pH inicial menos pH final).

2a. Muestra. 0.2 ml. 0.002 mg.

$$\Delta \text{pH}_B = 8.6 - 6.4 = 2.2$$

$$\Delta \text{pH}_M = 8.6 - 6.4 = 2.2$$

$$\% = \frac{2.2 - 2.2 \times 100}{2.2} = 0$$

3a. Muestra. 0.5 ml. 0.8 mg.

$$\Delta \text{pH}_B = 8.6 - 6.4 = 2.2$$

$$\Delta \text{pH}_M = 8.6 - 6.45 = 2.15$$

$$\% = \frac{2.2 - 2.15}{2.2} \times 100 = \frac{0.5 \times 100}{2.2} = \frac{5}{2.2} = \underline{\underline{2.27\%}}$$

4a. Muestra 0.8 ml. 0.13 mg.

$$\Delta \text{pH}_B = 8.6 - 6.4 = 2.2$$

$$\Delta \text{pH}_M = 8.6 - 6.5 = 2.1$$

$$\% = \frac{2.2 - 2.1 \times 100}{2.2} = \frac{10}{2.2} = \underline{\underline{4.54\%}}$$

5a. Muestra 1. ml. 0.16 mg.

$$\Delta \text{pH}_B = 8.6 - 6.4 = 2.2$$

$$\Delta \text{pH}_M = 8.6 - 6.55 = 2.05$$

$$\% = \frac{2.2 - 2.05 \times 100}{2.2} = \frac{15}{2.2} = \underline{\underline{6.81\%}}$$

6a. Muestra 1.75 ml. 0.28 mg.

$$\Delta \text{pH}_B = 8.6 - 6.4 = 2.2$$

$$\Delta \text{pH}_M = 8.6 - 6.65 = 1.95$$

$$\% = \frac{3.2 - 1.65 \times 100}{2.2} = \frac{55}{2.2} = \underline{\underline{25\%}}$$

7a. Muestra 3.2 ml. 0.56 mcg.

$$\Delta_{\text{PHB}} = 8.0 - 6.8 = 1.2$$

$$\Delta_{\text{PHH}} = 8.6 - 7.6 = 1.0$$

$$\% = \frac{3.2 - 1.0 \times 100}{2.2} = \frac{120}{2.2} = \underline{\underline{54.54\%}}$$

8a. Muestra 4.5 ml. 0.72 mcg.

$$\Delta_{\text{PHB}} = 2.2$$

$$\Delta_{\text{PHH}} = 8.6 - 7.8 = 0.8$$

$$\% = \frac{2.2 - 0.8 \times 100}{2.2} = \frac{140}{2.2} = \underline{\underline{63.63\%}}$$

9a. Muestra 6.0 ml. 0.96 mcg.

$$\Delta_{\text{PHB}} = 2.2$$

$$\Delta_{\text{PHH}} = 8.55 - 8.0 = 0.55$$

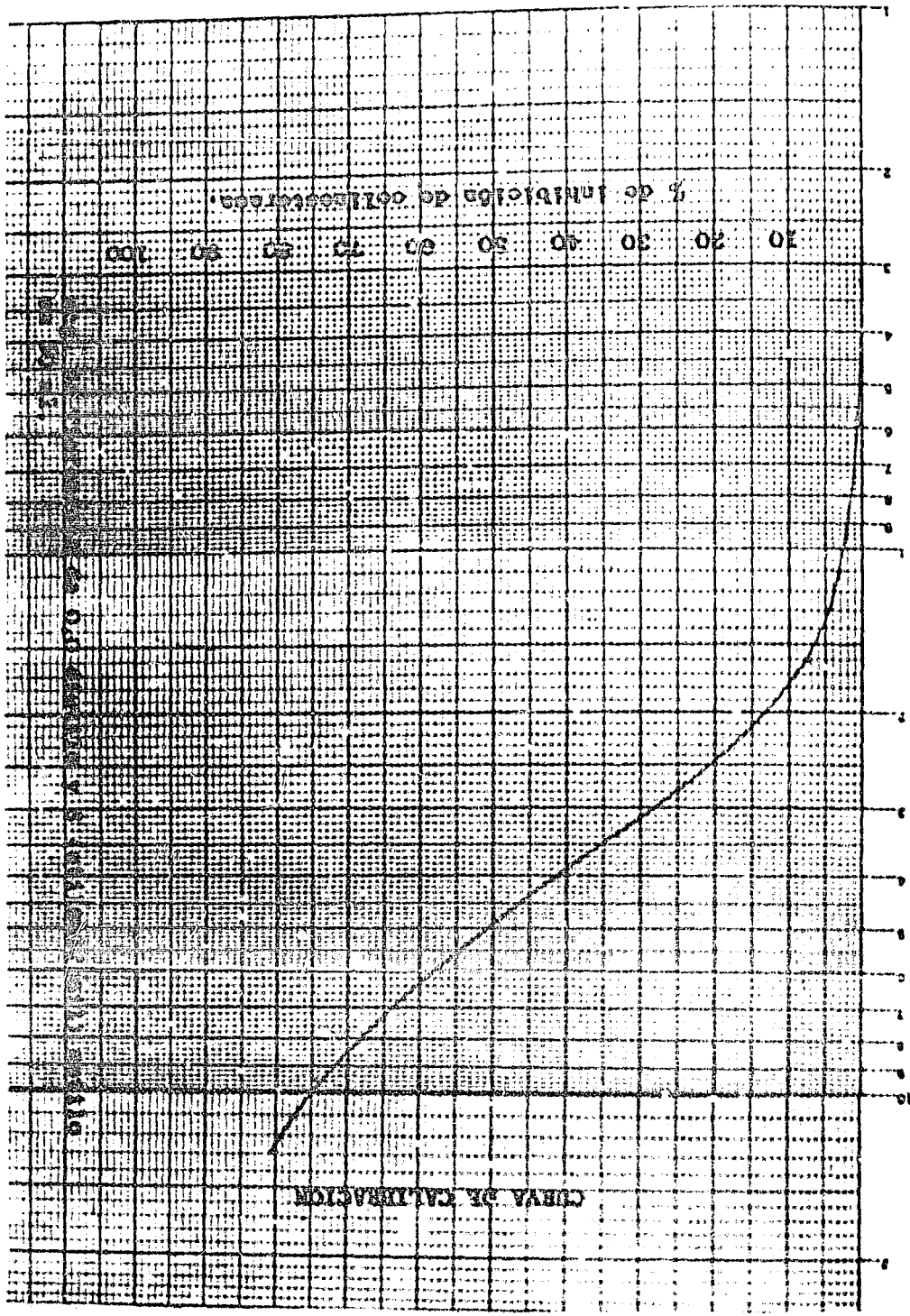
$$\% = \frac{2.2 - 0.55 \times 100}{2.2} = \frac{165}{2.2} = \underline{\underline{75\%}}$$

10a. Muestra 8 ml. 1.28 mcg.

$$\Delta_{\text{PHB}} = 2.2$$

$$\Delta_{\text{PHH}} = 8.55 - 8.1 = 0.45$$

$$\% = \frac{2.2 - 0.45 \times 100}{2.2} = \frac{175}{2.2} = \underline{\underline{79.54\%}}$$



PERCENTAGE OF HUMIDITY OF %

00 05 10 15 20 25 30 35 40 45

PERCENTAGE OF CALIBRATION

PERCENTAGE OF CALIBRATION

Comparación del método de extracción empleando diferentes solventes.

Como parte complementaria en el presente trabajo, se investigó si el uso de varios solventes de mayor o menor poder eluyente que el cloroformo usado, podrían proporcionar mejores resultados al extraer el último metabolito activo en que se transforma el thimet ferato.

Para seleccionar dichos solventes se tomaron en consideración los siguientes puntos:

1.- Su diferente densidad con respecto al agua - (ya que durante el proceso de extracción al centrifugar - el producto macerado es necesario separar las fases líquidas.)

2.- Volatilización. (En cantidades importantes - podrían acarrear pérdida de solvente o extracto y por lo tanto falsearían los resultados.)

3.- Poder eluyente. (Disminuido no recuperaría - parcial o completamente el metabolito final.)

4.- Polaridad.

5.- Asequibilidad.

6.- Costo.

Tomando en cuenta los puntos arriba mencionados se seleccionaron los siguientes solventes:

- 1.- Cloroformo.
- 2.- Benceno.
- 3.- 1,2 Dicloroetano.
- 4.- Hexano.

Para comparar la capacidad de extracción de los solventes elegidos, se corrieron series de análisis de muestras de papa no tratadas, empleando los métodos descritos anteriormente, pero añadiendo cantidades conocidas de una solución tipo de calibración al principio de la maceración en el proceso de extracción.

El % de inhibición calculado en cada muestra se expresa en microgramos del último metabolito activo del thimet, y se encuentra por medio de la curva de calibración. La diferencia entre los microgramos encontrados en las muestras y del testigo dan los microgramos del metabolito recuperado; a su vez la relación entre los microgramos recuperados y los microgramos añadidos originalmente nos dan un % de recuperación.

Al graficar en un par de ejes cartesianos el % de recuperación (eje de las ordenadas) y los microgramos del metabolito añadidos (eje de las abscisas) podemos apreciar la capacidad de extracción de los solventes empleados, observando la tendencia de las líneas graficadas.

A continuación se tabulan los resultados obtenidos en las series de análisis, durante los procesos de extracción, usando los solventes elegidos e inhibición de colinesterasa.

Series con Cloroformo - Benceno

1,2 Dicloroetano y Hexano

No. de Análisis	ml. de Sol. tipo de calibración - añadido	H ₂ O añadido (ml)	Solvente añadido (ml)	Peso de muestra tomado (g)	Alicuota de solvente tomada (ml)
1	0	100	100	100.1257	68
2	1.8	100	100	100.0037	68
3	2.5	100	100	100.0037	68
4	4.0	100	100	100.0427	64
5	8.0	100	100	100.0157	68
6	0	100	100	100.0112	26
7	1.8	100	100	100.0685	18
8	2.5	100	100	100.0070	19
9	4.0	100	100	100.0725	41
10	8.0	100	100	100.0957	41
11	0	100	100	100.0177	69
12	1.8	100	100	100.0030	68
13	2.5	100	100	100.0021	67
14	4.0	100	100	100.0110	67
15	8.0	100	100	100.0347	68
16	0	100	100	100.0020	31
17	1.8	100	100	100.0220	40
18	2.5	100	100	100.0030	33
19	4.0	100	100	100.0230	44
20	8.0	100	100	100.0130	38

1 al 5 Cloroformo.
6 al 10 Benceno.
11 al 15 1,2 Dicloroetano.
16 al 20 Hexano.

Serie con Mezclas.

No. de análisis	ml. de sol. tipo añadido de.	pH obtenido a 33 C y a					ΔpH	% de inhibición.	Ag. del tipo de calibración. añadidos encentrados	Ag recuperados.	% de recuperación.
		90 Min.	150 Min.	190 Min.	ΔpH	ΔpH					
Blanco	0	8.3	7.1	6.3	2.3	-	-	-	-	-	-
16	testigo (o)	8.3		6.6	-	1.7	22.7	0	0.25	-	0
17	1.8	8.3		6.5	-	1.8	18.2	0.28	0.29	0.02	0
18	2.5	8.3		6.0	-	1.4	38.4	0.40	0.36	0.11	28
19	4.0	8.2		7.0	-	1.2	45.8	0.60	0.44	0.19	32
20	8.0	8.2		6.8	-	1.4	36.4	1.28	0.28	0.11	9

Cálculo del tiempo total requerido de incubación.

$$\frac{\Delta t}{\Delta pH} \times \Delta pH_{11} = \text{tiempo total requerido.}$$

$$\Delta t = 90 \text{ Min.}$$

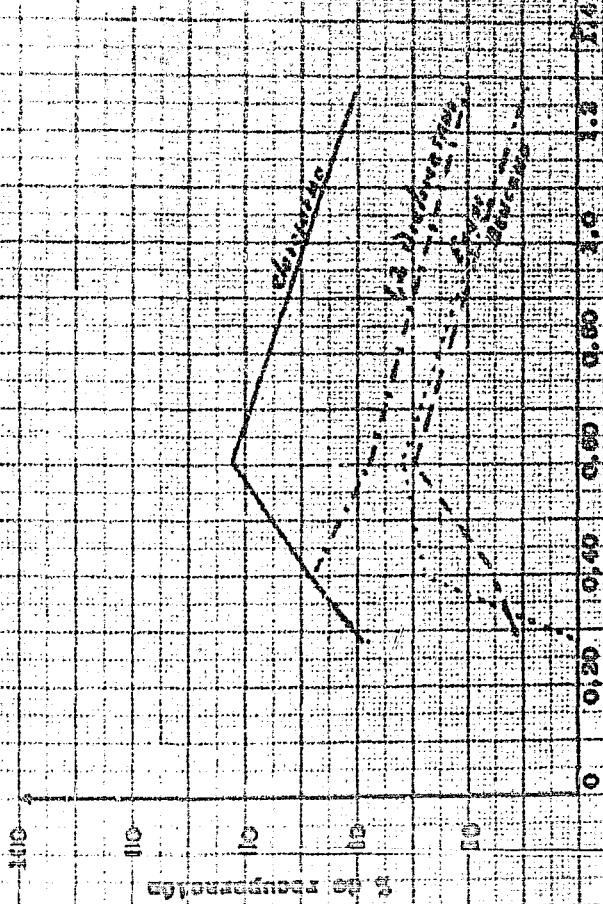
$$\Delta pH = 8.3 - 7.0 = 1.3$$

$$\Delta pH_{11} = 8.3 - 6.0 = 2.3$$

Sustituyendo valores

$$\frac{90}{1.3} \times 2.3 = 108 \text{ minutos} \quad \therefore \quad 90 + 108 = 198 \text{ minutos.}$$

Comparación del Método de Extracción.



mg. del tipo de calibración añadido

CAPITULO V
RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los analisis de las muestras de papa variedad alpha en el lote experimental dan el contenido aparente y se expresan en ppm de tiosulfato de O,O dietilo y S (etilsulfonil) metilo.

Tabla No. I

Tratamiento	Repeticiones			
	I	II	III	IV
1	0.0036'	0.0040'	0.0031''	0.0067'
2	0.0032'	0.0027'	0.0025'	0.0043
3	0.0075	0.0033'	0.0039	0.0039
4	0.0038	0.0032	0.0032	0.0035
5	0.0073'	0.0046'	0.0033'	0.0073
6	0.0073	0.0071	0.0032	0.0039'
7	0.0052	0.0051	0.0026	0.0039
8	0.0040	0.0051	0.0046	0.0033'

- ' Promedio del analisis de dos muestras.
- '' Promedio del analisis de tres muestras.

De la tabla anterior obtenemos el contenido neto en cada muestra analizada (ppm muestra - ppm del testigo).

Tabla No. II

Tratamiento	Repeticiones.				Promedio
	I	II	III	IV	
2	-0.0004	-0.0013	-0.0038	-0.0004	-0.0016
3	0.0009	0.0019	0.0002	0.0022	0.0011
4	0.0000	0.0042	0.0021	-0.0032	0.0015
5	0.0007	0.0000	-0.0008	0.0008	0.0001
6	0.0007	0.0031	0.0031	-0.0009	0.0015
7	-0.0014	0.0011	-0.0035	0.0001	0.0009

Los resultados obtenidos en la comparación de extracción del último metabolito activo del thimet se expresan como % de recuperación.

Tabla No. III

% de Recuperación.

G. del metabolito añadido	Cloroformo	Benceno	1,2 Diclroetano	Hexano
0.28	39	11	39	0
0.40	49	15	48	28
0.60	62	30	38	32
1.28	40	9	20	9

CONCLUSIONES.

De las Tablas números I y II se desprende lo siguiente:

1o. Cuando el control de insectos oburgadores en cultivos de papa variedad alpha, se lleva a cabo con thimet forato de acuerdo con las concentraciones y formas de aplicación usadas en el presente experimento, prácticamente no deja residuos de metabolitos tóxicos y por lo mismo no pueden considerarse nocivos para el consumo humano, según puede comprobarse examinando las dosis tóxicas determinadas biológicamente por la American Cyanamid Co., en su información toxicológica sobre pesticidas. (3)

2o. De la Tabla número III se aprecia que durante el estudio comparativo con diferentes solventes para determinar uno más adecuado químicamente en el proceso de extracción del último metabolito activo del thimet, el cloroformo usado en el presente trabajo resultó ser el más apropiado.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFIA.

- 1) Anónimo.- Estadísticas de la Dirección de Economía Agrícola S.A.G. México, 1962.
- 2) Anónimo.- Talbot Manual. American Cyanamid Co. 1958.
- 3) Curry H. Arthur, M. Kress H. Lois, Paylor A. L. Robert. Determinations of Residues of Phorate and its Insecticidally Active Metabolites by Cholinesterase Inhibition. Stanford Research Laboratories American Cyanamid Co. 1961.
- 4) De Ong ER Chemistry and Uses of Pesticides. 2o. Edition. Reinhold 1959.
- 5) Golz H. Harold, Boyd Shaffer C.- Información Toxicológica Sobre los Pesticidas de Cyanamid.- Agricultural - Department Cyanamid International.
- 6) Lederer Edgar, Lederer Michael. Chromatography.- Elsevier Publishing Co. 1957.
- 7) Metcalf L. Robert - Organic Insecticides their Chemistry and Mode of Action. Interscience Publishers Inc. 1958.
- 8) O'Brien Richard - Toxic Phosphorus Esters - Academic - Press 1960.