

T  
544.92  
F981a  
1971  
F.C.C.QQ

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

077847

Ej: 2

113

**APLICACION DE LA CROMATOGRAFIA  
EN LA INVESTIGACION Y  
ERRADICACION DE LA MALARIA  
EN EL SALVADOR**

TESIS DOCTORAL

Presentada por

**FERNANDO MAURICIO FUNES**

Como acto previo de su investidura  
académica para optar el Título de  
**LICENCIADO EN QUIMICA BIOLOGICA**

---

Agosto de 1971

San Salvador,

El Salvador,



Centro América

UES BIBLIOTECA CENTRAL



INVENTARIO: 10120420

U N I V E R S I D A D   D E   E L   S A L V A D O R

RECTOR

Dr. Rafael Menjívar.

SECRETARIO GENERAL

Dr. Miguel Angel Sáenz Varela.

FACULTAD   DE   CIENCIAS   QUIMICAS

DECANO

Dr. Raúl Arévalo Alvarez.

SECRETARIO

Dra. Amelia R. de Cortés,

JURADO CALIFICADOR DE TESIS:

Dr. Pedro Geoffroy Luna.

Dr. Ovidio Vásquez Gil.

Dr. José Antonio Recinos.

A mis queridos padres: Ulices Funes Góchez y Leonor Aguirre de Funes, como el - fruto de sus sacrificios y sabios consejos - esperando con ello, no haberlos defraudado.

A mi queridísima esposa: María Olga Velásquez de Funes, que con cariño y devo-- ción supo ofrecerme su preciosa ayuda y su- apoyo moral en la realización de este sueño.

A mis hijos: Mauricito y Noycita, - como muestra sincera de mi esfuerzo.

A mis compañeros de promoción, pro- fesores y amigos.

Agradezco sinceramente:

Al Dr. Pedro Geoffroy Luna, por su ayuda desinteresada en la elaboración de la idea.

Al Dr. Charles W. Miller.

A los Laboratorios del Centro de Investigación de Malaria por la colaboración que en todo momento me fue brindada.

A todas las personas que en una u otra forma pusieron su grano de arena en la elaboración de este trabajo.

I I F I C I O

I.-	INTRODUCCION .....	4
II.-	MATERIALES Y METODOS .....	4
III.-	RESULTADOS .....	40
IV.-	DISCUSION Y CONCLUSIONES .....	55
V.-	RESUMEN .....	60
VI.-	BIBLIOGRAFIA .....	66

## I N T R O D U C C I O N

Son muchos los factores, que los especialistas necesitan estudiar, para resolver el problema de la Erradicación de la Malaria, tales como: estudios ecológicos del vector, entre los que tienen principal importancia, los criaderos de anofelinos, tanto en la estación seca como lluviosa, su distribución por estación, estudios de preferencia alimentaria, grados de edad fisiológica, susceptibilidad al *plamodium*, etc.

Otro aspecto, es el referente a los estudios de control del vector, sobre todo, aquellos que se refieren a la actividad fumigante y residual de distintos pesticidas, así como la susceptibilidad y resistencia a los mismos.

No podemos dejar de mencionar, el estudio de la epidemiología de la malaria, así como actividades en la educación sanitaria,

En tan extensa labor, es indiscutiblemente necesaria, la participación de científicos y técnicos con especializaciones definidas, tales como: Parasitólogos,-

Entomólogos, Biólogos, Químicos, Epidemiólogos, Técnicos de laboratorio, así como Educadores de Salud Pública, -- por consiguiente, en cada especialidad, se aplican diversos métodos científicos de investigación, según el caso a estudiar.

La Cromatografía, ha venido a contribuir eficazmente a los estudios de control del vector, para investigar, entre otros, la actividad fumigante y residual de los pesticidas, así como la susceptibilidad y resistencia que presentan los anophelinos a estos compuestos.

El objeto del presente trabajo es, contribuir con las técnicas cromatográficas de capa fina y de fase gaseosa:

- 1o. En establecer diferencias, entre larvas de anophelos susceptibles, de aquellos resistentes al DDT.
- 2o. Determinar cantidades de pesticidas en muestras naturales, específicamente en  $H_2O$  y follajes después de la aplicación del compuesto Malathión.
- 3o. Determinación de la cantidad de insecticid



da, que puede absorber un zancudo a través de sus patas después de haber estado en contacto con una superficie fumigada con DDT.

40. Determinación de pesticida en el aire ambiental (poder fumigante) en lugares que han sido fumigados.

## MATERIALES Y METODOS

Para llevar a cabo la siguiente técnica se que  
de disponer:

- 1o. De las placas de vidrio con capa fina de Sílica Gel, las cuales se pueden elaborar fácilmente, con el equipo correspondiente en el laboratorio.
- 2o. De placas de Plástico o Aluminio o Cromato placas, proporcionadas por diversas casas especializadas y a la venta en plaza.
- 3o. Papel filtro Whatman No. 3 que es el que más se ha utilizado en el presente método, por su fácil adquisición, manipulación y archivo.

Método No. 1.

Micrométodo para la preparación de muestras de larvas de mosquito, del género Anopheles, con el fin de establecer diferencias, entre los que son resistentes y-

los que son susceptibles al Dicloro Difeníl Tricloroetano DDT por Cromatografía en capa fina o papel, (8).

A-Materiales.

10. Larvas de mosquito de cuarto estado.
20. Tubos U, especiales para microextracciones con su respectiva barra trituratora, (Fig. No. 1).
30. Pipeta de 1 y 2 cc. graduadas en décimos de ml.
40. Tapones de corcho para las bocas de los tubos U.
50. Discos de papel filtro Whatman No. 3 de 0.5 cm. de diámetro.
60. Bulbo de hule o aparato de aire para soplar o empujar por aire.
70. Micropipetas de 5, 10, 25 y 50 ul.
80. Tiras de papel Whatman No. 3 de 1 pulgada y media de ancho y 25 pulgadas de largo.
90. Placas de vidrio con capa fina o cromatoplasmas en plástico de 1 pulgada y media de ancho, capa de Sílica Gel.

- 10o. Alfileres para sostener y secar los discos con muestra,
- 11o. Sostén para colocar al aire los alfileres con los discos, (Fig. No. 2).
- 12o. Tanque revelador con tapadera de vidrio.

#### B-Aparatos Especiales.

- 1o. Lámpara ultravioleta (15 ó 30 W),
- 2o. Fluorómetro Turner Modelo 110.
- 3o. Cuarto oscuro con foco rojo y verde.
- 4o. Balanza analítica sensible.

#### C-Reactivos.

- 1o. Alcohol 80 % (Etanol).
- 2o. Cloroformo.
- 3o. Butanol.
- 4o. Acido acético.
- 5o. Agua destilada.

#### D-Procedimiento.

Este método es aplicable para sustancias biológicas, las cuales por la pequeña cantidad presente o -- porque su peso no lo permite, sería casi imposible un -- análisis, es decir, se pueden analizar pesos de 2 ug. y volúmenes de 10 ul. con resultados óptimos, (3).

Casi todos los pasos de la marcha analítica, -- se verifican en un cuarto oscuro, pudiendo encender nada más, una luz roja, a excepción del paso de la pesada del material a analizar y la introducción a la boca del tubo U que se puede hacer en la luz natural.

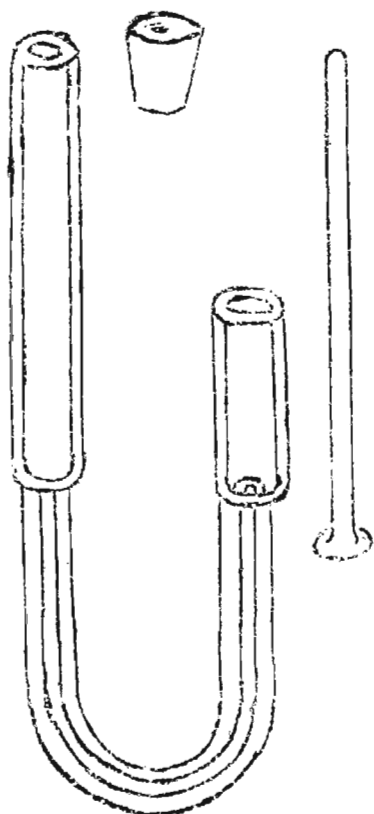


Figura No. 1.

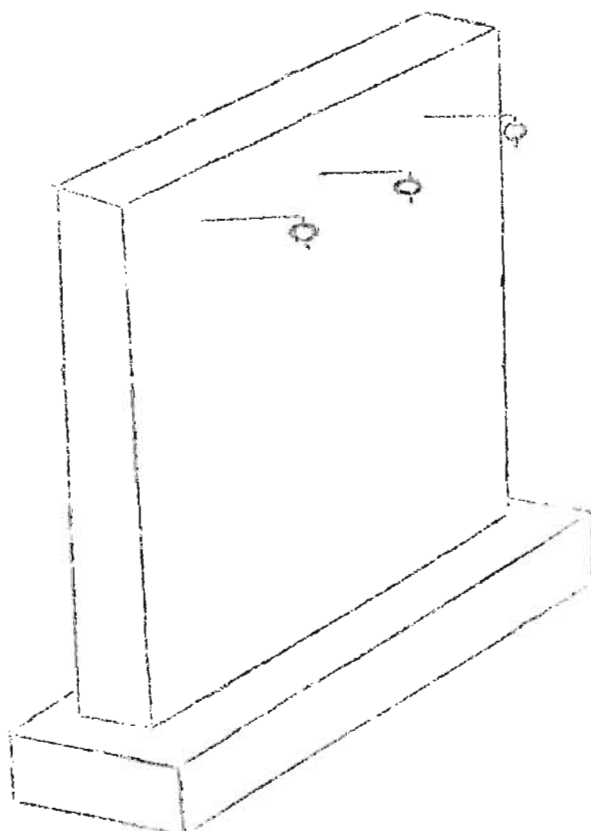


Figura No. 2.

El tubo U consiste en dos tubos de vidrio de  $\frac{1}{4}$  de pulgada de diámetro interno, unidos por un tubo capilar de  $\frac{1}{4}$  de pulgada de diámetro externo, haciendo el arco de la U en la sección que le corresponde al tubo capilar, (Fig. No. 1).

Uno de los brazos del tubo es más corto que el otro y es allí donde se ha de trabajar, el otro brazo es para recibir el material resultante de la extracción o extracto.

Para comenzar a trabajar, se deben de disponer de larvas de mosquitos de cuarto estado, es decir el estado próximo inferior a Pupa, de las colonias a discusión, la Resistente y la Susceptible. Cada larva pesa más o menos 1.5 mg. y necesitaremos para nuestro ensayo 30 mg. lo que quiere decir que utilizaremos de 15 a 20 larvas por tubo.

Se coloca un disco de papel filtro en el brazo más corto del tubo U, tapando con un tapón de corcho el otro extremo del tubo. Se pesan exactamente 30 mg. de larvas de zancudo Anopheles en cada tubo en este caso, dos, marcándose cuidadosamente, para su fácil identificación.

De aquí en adelante todos los pasos son verificados en un cuarto oscuro con una luz roja.

Agregar con una pipeta 0.5 ml. de Etanol al 80% al brazo del tubo que contienen las larvas y triturarlas hasta que quede una suspensión casi homogénea.

Dejar en reposo durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, un bulbo de hule o pequeño compresor se coloca en la boca del brazo corto del tubo U, quitando el tapón del otro extremo y obligando por presión a que el líquido pase por el capilar, hacia el brazo largo, colocando nuevamente el tapón, pero ahora en el brazo corto, para evitar que el líquido se regrese al brazo corto. Este líquido es el concentrado de larvas de zancudo.

A este concentrado, se le agrega 1.5 cc. de cloroformo para extraerle los aminoácidos, que son los que a nosotros nos interesan, dejando nuevamente en reposo por otros 30 minutos.

Al cabo del tiempo transcurrido, se notará una capa clara que contiene nuestro problema, el cual con una pipeta de 25 ul., se aplica a un disco de papel-

filtro, que previamente se ha colocado en el aire con un alfiler, para que seque rápido o sobre capa fina, haciendo contactos con la pipeta para mojar, cuidando que el punto no pase de  $1/2$  cm. de diámetro.

Esta operación se verifica, en todos los casos, hasta completar 100 ul. En el caso de las placas, éstas estarán listas para su desarrollo inmediatamente después que seque, pero en el caso de los discos, éstos se colocarán en un extremo de su tira de papel filtro correspondiente, identificándolos cuidadosamente.

Para colocar los discos en el papel, se procura hacer dos cortaduras con utensilio con filo, a una pulgada de la superficie del solvente, colocando el disco con una pinza, a manera de no contaminar con nuestros dedos, ni el papel ni el disco, para evitar falsos resultados.

Listas las placas, o el papel, se prepara una cubeta o tanque revelador que tenga una altura igual o mayor a la longitud de las tiras de papel o de las placas, a manera que sea sólo una pequeña parte la que penetre en el solvente y el demás cuerpo quede completamente en el aire; esta cubeta se prepara, colocando en su inte



rior un líquido solvente, para que sea absorbido por el-  
por el material absorbente (papel o sílica gel) y éste -  
puede separar las sustancias que se han concentrado en -  
el disco y en el punteado sobre la capa fina de Sílica -  
Gel.

El solvente que fue utilizado para este traba-  
jo se preparó de la siguiente manera: en un embudo o ---  
frasco separador de 500 cc. se colocaron, Butanol, agua-  
y ácido acético en proporción 4:1:5, por ejemplo 100 cc.  
de Butanol, 125 cc. de agua y 25 cc. de ácido acético --  
glacial, se agitó vigorosamente por 3 - 5 minutos y de--  
jar en reposo por 30 minutos, eliminar la capa de abajo-  
y dejar nuevamente en reposo por una hora y descontar de  
1 - 5 ml. Con la capa que queda, que es la capa supe---  
rior, se bañan las paredes internas de la cubeta, colo--  
cando en su interior las placas, procurando que la super-  
ficie del líquido solvente, quede uniformemente horizon-  
tal, y así pueda subir uniformemente y se verifique una-  
buena separación. En el caso del papel, éstos irán pen-  
dientes de la tapadera de la cubeta y se dejarán para su  
desarrollo durante 16 horas.

Después de ese tiempo se sacan las tiras o las  
placas de la cubeta y se secan al aire.

Con lámpara ultravioleta se observa, para ver la separación de las sustancias componentes del cuerpo del zancudo, (Figs. 3,4,5,6,7,8,9 y 10).

Los papeles ya secos se interceptan y se leen por fluorometría utilizando un fluorómetro Turner modelo 110.

#### Método No. 2.

Determinación de pequeñas cantidades (ULV) de Pesticidas en muestras naturales, (Zacate, caña de azúcar, hojas, pelos, H<sub>2</sub>O) por Cromatografía de Gases después de su aplicación. En este caso, Malathión.

#### A-Materiales,

- 1- Muestras de H<sub>2</sub>O, hojas de caña de azúcar, zacate, etc.
- 2- Columnas Cromaflex tamaño 250 cc. (Kontes-Cat No. K),
- 3- Erlenmeyers de 250 cc. con tapón de rosca.
- 4- Embudos separadores de 1.000 cc.

- 5- Embudos de vidrio.
- 6- Probeta de 100.
- 7- Balones para evaporación con tapón esmerilado.
- 8- Pipetas de 5 cc.
- 9- Embudos Gooch.
- 10- Bomba de vacío.
- 11- Algodón de vidrio.
- 12- Tijeras.

#### B-Aparatos Especiales.

- 1- Molino o Licuadora.
- 2- Mezclador Vortex o equivalente.
- 3- Evaporador o Concentrador eléctrico o a Baño maría.
- 4- Freezer.
- 5- Cromatógrafo de Gases y Grabador.

#### C-Reactivos.

- 1- Sulfato de Sodio  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  Granular anhidro. químicamente puro.

- 2- Acetonitrilo bidestilado.
- 3- Cloruro de Sodio  $ClNa$  químicamente puro.
- 4- Fluorisil 60 / 100 mesh.
- 5- Eter de Petróleo bidestilado.
- 6- Eter Etilico bidestilado.
- 7- Alcohol Etilico absoluto.

#### D-Procedimiento.

El insecticida se riega por sistema aéreo o por bomba manual y de todas las cosas posibles, con que el insecticida puede hacer contacto, se toma cuidadosamente una muestra (agua, zacate, animales pequeños, tierra, etc).

De estas muestras se toma 10 a 20 gramos, reduciendo a su tamaño más pequeño, las de tamaño grande, con una tijera. Se colocan en un recipiente individual de licuadora, con sus aspas respectivamente, identificándolas cuidadosamente, agregándole en seguida 30 a 60 gr. de  $SO_4Na_2$  granular y anhídrido para que cristalice y se facilite su pulverización. Para mejores resultados, se ponen los recipientes al freezer para que congele y pueda reducirse a polvo, rápidamente.

Terminada ésta operación, este polvo se trasladada a Erlenmeyer, de 250 cc., (6) identificados respectivamente, recuperando la mayor cantidad posible, agregándole después 100 cc. de acetronitrilo para su extracción.

Estos Erlenmeyers se colocan en Mezclador mecánico Vortex o equivalente, a velocidad máxima por media hora.

Transcurrido este tiempo, se filtra el contenido de los Erlenmeyers en filtros Gooch, lavando los Erlenmeyers con 15 cc. de Acetonitrilo, por dos veces y agregándolos al Embudo Gooch. Esta filtración tiene que ser ayudada por una bomba de vacío para que pase rápido y completo.

La Torta resultante, se lava con 50 cc. más Acetonitrilo.

Este filtrado, se coloca en un embudo separador de 1000 cc. lavando con 10 cc. de Acetonitrilo el recipiente de donde viene el filtrado, para perder lo menos posible.

A este filtrado, se le agrega solución de ---

ClNa saturada, para evitar emulsión y se lava con 600 cc. de agua destilada y lavada y luego 100 cc. de Eter de Petróleo, de pureza comprobada, después de bidestillarlo. Se agita vigorosamente, dejando escapar los gases resultantes para evitar explosión, por tres o cuatro minutos y se deja reposar.

Este momento se aprovecha, para preparar baloncitos de 250 cc. para evaporación, sobre los cuales se han colocado embudos de vidrio taponeados con algodón de vidrio extraídos y colocando sobre él, cantidad de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  Anhídrido y puro para recibir el Eter de Petróleo.

Terminado el paso anterior, la capa inferior de los embudos separadores se retiene para una segunda extracción, mientras que la capa de Eter de Petróleo se hace pasar por el embudo con  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  con el fin de deshidratarla, lo mismo se hace con la segunda extracción y coleccionando los 200 cc. de Eter de Petróleo, para evaporar hasta un volumen de 3-5 cc.

Para llevar a cabo la operación de evaporado, se pueden utilizar diferentes artefactos que produzcan calor, con el cuidado de no alcanzar temperaturas muy altas y dejar escapar, por exceso de calor, el insecticida buscado.

Obtenido el 3-5 cc. de extracto, se tapan los balones con tapón de vidrio, mientras se preparan columnas Cromaflex de 250 cc., de la siguiente manera para su fraccionamiento: (5).

Se colocan 4 pulgadas, de la altura de la columna Cromaflex, de Fluorisil, el cual ha sido activado en un horno a 130°C. y sobre él se agregan 1/2 pulgada de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  anhidro y puro procedente también del horno. Ya preparada la columna y fría, se empaqueta con unos leves golpes hasta que ya no baje, la columna así empaquetada está lista para su uso.

La columna se humedece con 50 cc. de Eter de Petróleo bidestilado y sobre la última capa de éste eluyente, con una pipeta se coloca el extracto que habíamos dejado esperando en los balones con tapón de vidrio, lavando éstos con 2 ó 3 cc. de Eter de Petróleo y agregando a la columna.

Sin dejar que se seque la superficie del  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ , se le agrega 200 cc. de solución al 6 % de Eter Etilico en Eter de Petróleo como eluyente, el cual se colecciona en recipiente identificado cuidadosamente, pues aquí se han separado otras sustancias, que en nuestro ca-

so, no nos interesan. La misma operación se hace con soluciones al 15 y al 50 % de Eter Etílico en Eter de Petróleo. El Eter Etílico lleva el 2 % de alcohol etílico para evitar la presencia de peróxido, (2 cc. de Etanol 90° en 98 cc. de Eter Etílico).

Obteniendo nuestro pesticida Malathión, con el eluyente al 50 %, los demás, podemos descartarlos.

Una vez obtenido el eluyente, en que se encuentra nuestro insecticida, se reduce por evaporación, a un volumen de 100 cc. y éste está listo para su inyección en el cromatógrafo de gases, usando Captura de Electrones o Detector de Llama para Fósforo colocando una columna de vidrio de  $\frac{1}{4}$ " O.D. por 6 pies de largo, conteniendo como fase estacionaria, una mezcla de 2.5 % DC. 200 y 2.5 % Q F-1 de 100 / 120 mesh.

La temperatura del inyector, columna y detector será de 200°C. el flujo del  $N_2$  para EC. será de 30 ml/m. y el de  $H_2$  para detector de llama de 20 ml/m. y 120 ml/m. de aire comprimido y los trazos de la respuesta grabados en grabador especial, Honeywell.

E-Cálculo.



Con microjeringa, antes de inyectar los problemas, se inyecta un standard previamente preparado, es decir 5 ul. con 5 Ng. (nanogramos) de muestra, resultando en la respuesta del Grabador, un pico a una distancia determinada (cuadro No. 9), la altura del pico representa la cantidad de insecticida que hay en los 5 ul. por lo que se hace una curva para los cálculos correspondientes (cuadro No. 10). Inmediatamente después, se inyecta la misma cantidad (5 ul.) de cada problema; de la altura resultante de cada pico, se calcula la cantidad que hay en relación al standard, después, se calcula lo que hay en el volumen de extracto total, para aplicar la fórmula siguiente:

p.p.m. = partes por millón.

$$\text{p.p.m.} = \frac{V w d_2}{v W d_1}$$

de donde:

W = peso de la muestra en gramos.

w = Peso del standard inyectado en Ng.

V = Volumen del extracto que salió en ml.

v = Volumen del extracto inyectado en ul.

d<sub>2</sub> = Respuesta del grabador por la muestra.

d<sub>1</sub> = Respuesta del grabador por el standard.

Para la extracción de las muestras de  $H_2O$  se usó el método de Teasley y Cox, (11) usando un litro de las muestras, extrayendo con cloroformo en un embudo separador y evaporar el extracto casi a sequedad y enseguida llevado a un volumen de 5 cc. con Eter de Petróleo, - que serán fraccionados luego con fluorisil por el método ya descrito anteriormente.

### Método No. 3.

Determinación por Cromatografía de gases, la cantidad de insecticida que puede absorber un zancudo a través de sus patas, después de haber estado en contacto con una superficie fumigada con Dicloro Difencil Tricloro etano (DDT).

Esta prueba se realizó en un área aproximada de 3000 acres en las cercanías del Puerto de la Libertad.

Todos los mosquitos utilizados en esta prueba, fueron capturados o encontrados muertos a inmediaciones o en el interior de las casas que fueron rociadas con el ya conocido DDT, a él cual, los insectos ya han creado una marcada resistencia, principalmente, en las zonas en



donde hay riesgo de insecticidas aéreo por las plantaciones de algodón.

Cabe decir que esta prueba se realizó con el fin de determinar, si el insecticida usado funcionaba residualmente y que los mosquitos no morían, a causa de -- que no habían estado en contacto con la superficie rociada.

#### A-Materiales.

- 1o. Patas de zancudo cuidadosamente recortadas del cuerpo del insecto.
- 2o. Tubos en U especiales para extracción con su triturador, (Fig. No. 1).
- 3o. Pipetas de 1 y 2 cc. graduados en  $\frac{1}{10}$ .
- 4o. Círculos de papel filtro Whatman No. 3 de  $\frac{1}{2}$  cm. de diámetro.
- 5o. Columna Cremaflex Kontes de 50 cc. tamaño B ya preparados para fraccionar.
- 6o. Tubos de evaporación o concentradores tamaño 25 E Kontes.
- 7o. Tubos de ensayo con tapón esmerilado ---  $\frac{10}{22}$  Kontes con sus respectivos ganchos.

E-Aparatos Especiales.

- 1o. Evaporador o concentrador completo, con dos cámaras Sneider para columna, 2-14 y 2-19 (Kontes cat - 56900).
- 2o. Cromatógrafo de gases con detector S y su grabador.
- 3o. Bomba de vacío.

C-Reactivos.

- 1o. Hexano bidestilado.
- 2o. Solución de Metanol en Hexano al 1 %.

D-Procedimiento.

Primeramente se hace una prueba de sensibilidad al DDT, (10) con un grupo de zancudos susceptibles y otros resistentes al insecticida, por lo menos, cinco insectos de cada tipo y según el método utilizado por la OMS, usando como superficie de contacto, papeles impregnados con diferentes porcentajes de DDT, en tubos especiales, dejando a los insectos dentro de los tubos, du-

rante un tiempo determinado, por lo menos una hora, su-  
riendo algunos y quedando vivos otros al transcurso de  
ese lapso.

Los que quedaron vivos se matan con clorofer-  
mo, para poder separar sus patas con facilidad.

En otro tubo, se toman otros cinco zancudos,  
procedentes del lugar o área de estudio, se sacrifican pa-  
ra tomar sus patas.

Las patas así recortadas de cada zancudo, se  
colocan en tubos U, (1) debidamente identificados, dentro  
del brazo más corto, previa colocación de un disco de pa-  
pel filtro y con 0.5 cc. de Hexano se deshacen las patas  
con el triturador para su extracción.

El líquido resultante, se hace pasar a través  
del papel filtro por medio de una bomba de vacío, trasla-  
dando este extracto hasta el brazo más largo y de allí a  
un tubo concentrador.

Se vuelve a colocar  $\frac{1}{2}$  centímetro de Hexano  
sobre la pasta de patas, en el brazo corto y se vuelve a  
remover por unos segundos y del mismo modo, hacemos atra-

vezar el papel filtro hacia el otro brazo, colectándolo en el mismo tubo concentrador para completar 1 cc.

Este tubo concentrador con el cc. de extracto se lleva al evaporador para reducir el volumen a 0.3 ó 0.5 cc.

Como el resultado de la extracción de las patas, es una mezcla de sustancias que contaminan el insecticida obtenido, se hace pasar éste pequeño volumen, a través de una columna cromoflex, (4) previamente preparada y que viene de su activación de un horno a una temperatura de 130°C.

La columna ya fría, se humedece con 10 ml. de Hexano, sabiendo que este filtrado se ha de descartar, pero antes de que seque la última capa con la ayuda de una pipeta, se coloca el volumen de extracto de muestra, lavar el tubo concentrador con una pequeña cantidad de Hexano y agregar en la columna de la misma manera, comenzando en este momento, el fraccionado y colección de filtrado.

Sobre la muestra de extracto en la columna, se agregan 12 ml. de Hexano, recibiendo el filtrado, en-

un tubo concentrador de 25 cc. y sobre la última capa de éstos 12 cc. de Hexano se agregan 12 cc. de una solución al 1 % de Metanol en Hexano, recibiendo este filtrado en el mismo tubo concentrador hasta completar 24 cc.

Estos 24 cc. recogidos representan la fracción No. 1, la cual arrastrará Heptaclor, Aldrín, pp, DDE, op, DDT y pp, DET.

Con otro fraccionamiento se obtendrán otras insecticidas que por ahora no nos interesan.

El tubo concentrador que contiene los 24 cc. de extracto fraccionado, se lleva al evaporador y se condensa hasta un volumen de 0.3 cc. y se procede a inyectar al cromatógrafo 5 ul., usando como silueta, Electron Capture, haciendo diluciones básicas si es necesario, para obtener picos que se puedan comparar con un patrón previamente preparado que contenga 1 ug. de insecticida por ul. de solvente.

El cromatógrafo, se acondiciona para trabajar con DDT usando una columna de vidrio de 1/4 de pulgada OD, de 6 pies de largo, empacada con una mezcla de 2.5 % DC-200 y 2.5 % QF - 1 100/120 mesh. como fase estacionaria.

un tubo concentrador de 25 cc. y sobre la última capa de éstos 12 cc. de Hexano se agregan 12 cc. de una solución al 1 % de Metanol en Hexano, recibiendo este filtrado en el mismo tubo concentrador hasta completar 24 cc.

Estos 24 cc. recogidos representan la fracción No. 1, la cual arrastrará Heptaclor, Aldrín, pp, DDE, op, DDT y pp, DDT.

Con otro fraccionamiento se obtendrán otros insecticidas que por ahora no nos interesan.

El tubo concentrador que contiene los 24 cc. de extracto fraccionado, se lleva al evaporador y se condensa hasta un volumen de 0.3 cc. y se procede a inyectar al cromatógrafo 5 ul., usando como silueta, Electron Capture, haciendo diluciones básicas si es necesario, para obtener picos que se puedan comparar con un patrón previamente preparado que contenga 1 ug. de insecticida por ul. de solvente.

El cromatógrafo, se acondiciona para trabajar con DDT usando una columna de vidrio de  $\frac{1}{4}$  de pulgada OD. de 6 pies de largo, empacada con una mezcla de 2.5 % DC-200 y 2.5 % QF - 1 100/120 mesh. como fase estacionaria.



El Inyector se lleva a una temperatura de --- 185°C. y el Detector a 190°C., mientras que la Columna, - tendrá una temperatura de 185°C.

El Detector EC se acondiciona a una tempera- tura de 205°C y como fase movible se utiliza corriente - de nitrógeno, con un flujo de 40 a 41 cc. por minuto.

#### Cálculo

Para calcular la cantidad de DDT que hay en - las patas de los zancudos, se prepara un standard que -- contenga una mezcla de isómeros de DDT, cantidad exacta- mente pesada y disuelta en un volumen conocido de solven<sup>te</sup> te, (cuadro No. 11).

Se inyecta el cromatógrafo, con jeringa espe- cial, un volumen igual, al que se ha de inyectar de cada muestra, y con la respuesta del grabador se hace una cur<sup>va</sup> va en papel milimetrado (ver cuadro No. 12) y se compa-- ran las respuestas del grabador a los estímulos de los - extractos problemas (ver cuadro No. 13 y 14) con el pico respuesta al standard (cuadro No. 11), calculándose en - la curva en el papel milimetrado, en Nanogramos por mi-- crolitro, (cuadro No. 12).

La cantidad encontrada, se puede calcular tam

bién por el número de patas extraídas o individualmente una por una.

#### Método No. 4.

Cuando se ha aplicado un insecticida, los humanos y los animales están expuestos, por la ruta respiratoria, a causa de los vapores, a una intoxicación (poder fumigante) y es por eso que es necesario muestrear el aire ambiental y determinar las concentraciones de algunos compuestos que se supone deberían estar presentes.

El muestreo de los pesticidas en el aire es muy complicado, por el factor, que debe estar presente en forma de aerosol, vapores o en forma de partículas y el método siguiente adaptado para esa condición de estados.

Método para determinar la cantidad de OMS - - 33 o Baygón en el aire ambiental (poder fumigante) en -- los lugares donde ha sido fumigado con este insecticida.

#### A-Materiales.

10. Impinyers de 25 cc. (Fig. No. 11).

20. Frascos con tapón de rosca.
30. Embudos separadores de 60 cc.
40. Erlenmeyers de 125 cc.
50. Erlenmeyers de 10 cc.
60. Tubos de centrifuga de 15 cc. con tapón.
70. Pipetas de 1 cc. divididas en  $\frac{1}{10}$ , 1 cc.-  
2 cc. y 5 cc.

#### F-Aparatos Especiales.

10. Bomba muestreadora de aire (Unico air Sampler) que aspire 2.8 a 3 litros/minuto.
20. Centrífuga.
30. Cromatógrafo de gases y su Grabador.

#### C-Reactivos.

10. Hidróxido de sodio 0.05 N.
20. Acido clorhídrico concentrado.
30. Benzeno bidestilado
40. Solución al 2 % de anhídrido tricloroacético en benzeno.
50. Solución al 3 % de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$ .
60. Agua destilada extraída con benzeno bidestilado.

D-Procedimiento.

Después del rociado del lugar, se coloca una bomba muestreadora de aire que extraiga 2.8 litros o 3 .. litros/minute haciendo pasar el aire a través de un im-- pinger, (figura No. 11), (9) que contenga de 15 a 25 cc. de NaOH. 0.05 N durante 1 hora.

Obtenida la muestra, se traslada al laboratorio colocándose en un embudo separador de 60 cc., (10). El frasco en que se ha trasladado se lava con 5 cc. de NaOH. 0.05 N. para perder lo menos posible.

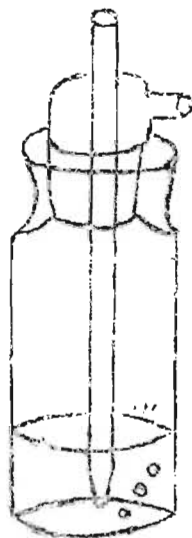


Figura No. 11.

Se acidula el volumen de NaOH con 1 cc. de ClH concentrado y se deja en reposo 15 minutos.

Se le agrega 5 cc. de Benceno bidestilado y -

se agita vigoramente durante 1 minuto para extraer. Se dejan separar las dos capas, el benceno por ser menos -- denso ocupa la capa de arriba y el NaOH la de abajo.

La capa inferior se recoge en un frasco limpio, para una segunda extracción. Lo mismo se hace con la capa superior en otro frasco pequeño.

Otra vez en el embudo separador, el NaOH se le agregan otros 5 cc. de Benceno y se agita vigorosamente por otro minuto y se dejan separar las capas.

Se separa la capa de abajo y esta vez se descarta. Se unen los últimos 5 cc. de Benceno a los obtenidos primeramente, lavando con un poco de NaOH. 0.05 N. el recipiente para recuperar la mayor cantidad posible.

Una vez libre los 10 cc. de Benceno extracto, de gotas de NaOH, se le agrega 2 cc. de Anhídrido Clorocético y 0.4 cc. de Piridina.

Se agita un poco y se deja en reposo de 15 a 30 minutos.

Después de ese tiempo se lava con 5 cc. de --

agua destilada, lavada con benceno.

Se descarta y luego se lava con 5 cc. de solución de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  al 3 % en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, lavada con benceno.

Se descarta la capa inferior o sea el  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  y la capa superior será de 12 cc. extracto del aire ambiental, que se traslada a un tubo de centrífuga con tapón de 15 cc.

Se centrifuga para separar las gotas de  $\text{H}_2\text{O}$  - que queden y el resultante ya estará listo para inyectar al Gas Cromatógrafo que estará adaptado para Carbamatos- con una columna de  $\frac{1}{4}$  de pulgada de 6 p. de largo empacada con el 3 % de OVI 60/80 mesh Detector  $205^\circ\text{C}$ , Inyector  $190^\circ\text{C}$ , Nitrógeno 40 cc/min.

#### E-Cálculo.

Para calcular la cantidad de insecticida, en cada muestra, se hace un standard de insecticida químicamente puro, se inyecta al cromatógrafo y con el pico respuesta del grabador, (cuadro No. 15) se hace una curva, - (cuadro No. 17) en papel milimetrado.

Se inyecta el mismo volumen de muestras y las respuestas, (tabla No. 15 y 16) se comparan con el standard y luego se calcula para el volumen de 12 ml., cantidad que se encuentra en el volumen de 168 litros, que son los litros que pasan por el impinger durante una hora.

Método para la preparación de Cromatoplasmas -  
en vidrio para Cromatografía en Capa Fina para pesticidas.

A-Materiales.

- 1o. Tablero de montaje para placas de vidrio.
- 2o. Extendedor especial que deje una capa de 250 micras.
- 3o. Placas de vidrio uniformemente pulidas de 2 pulgadas x 8 o más pulgadas de largo y 8 x 8 pulgadas.
- 4o. Secadero especial para placas.
- 5o. Desecador o estufa (horno).

B-Reactivos.

- 1o. Sílica Gel G.

2o. Agua Destilada y extraída.

C- Procedimiento.

Las placas de vidrio se lavan cuidadosamente con solución sulfocrónicas ( $\text{CrO}_4\text{K}_2 + \text{SO}_4\text{H}_2$ ) y luego con alcohol o acetona. Se dejan secar para remover la grasa.

Se montan en el tablero de montaje y sobre la primera placa se coloca el extendedor bien calibrado al espesor de la capa que se quiere.

Por otro lado, (2) en un vicker o Erlenmeyer de 250 cc. se pesan 35 gr. de Sílica Gel 3 y agregar 60-ml. de agua destilada y mezclar bien procurando no hacer espuma.

Rápidamente, esta mezcla se vierte por el depósito del extendedor, procurando que quede uniformemente lleno.

Una vez lleno, se toma el extendedor con ambas manos y se desliza sobre el tablero y sobre las otras placas, con un movimiento enérgico y uniforme, ni tan rápido ni tan despacio, a manera, de que la capa que



quede, sea uniformemente distribuida.

Las placas así preparadas, se dejan secar por un rato al aire indirecto de un ventilador y luego colocadas en un secadero especial y se introducen al horno a una temperatura de 130°C. para su activación durante 45 minutos o más.

Las placas activadas se guardan en un desecador para su utilización posterior.

Preparación de las columnas para el fraccionamiento de una mezcla de insecticida.

A-Materiales.

- 1o. Microcolumna Cromoflex tamaño B (Kontes - Cat K - 42010).
- 2o. Algodón de vidrio.
- 3o. Horno.

B-Reactivos.

- 1o. Fluorisil 60 / 100 mesh.

2o.  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  granular anhidro.

3o. Hexano Bidestilado.

4o. Metanol Bidestilado.

C-Procedimiento, (13).

Coloque un pequeño tapón flojo, de algodón de vidrio, después de haber sido lavado con Hexano bidestilado, en el extremo de una columna Cromoflex tamaño B.

Empacar la columna con 1.6 gr. de Fluorisil de 60 / 100 mesh, el cual ha sido activado por el fabricante de 1200°F.

Golpear nuevamente la columna hasta empacar -- bien el fluorisil, enseguida agregar  $\frac{1}{2}$  pulgada de -----  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  granular y anhidro y volver a empacar.

La columna así preparada, se lava con 50 cc. - de Hexano bidestilado, y sin dejar que seque la superficie, sobre la última capa de Hexano, agregar 50 cc. de metanol también bidestilado. Estos filtrados se descartan.

Las columnas así lavadas, se guardan en un hor

no a 130°C. hasta que se vayan a utilizar.

Extracción o lavado de todos los utensilios y reactivos utilizados en los procesos Cromatográficos.

A-Lavado y Extracción de Material de Vidrio.

Todo el material de vidrio, que se utiliza en cromatografía debe de ir bien lavado, usando para ello solución sulfocrónica ( $C_{12}O_4K_2$  cristalizado en  $SO_4H_2$  concentrado) o un buen detergente, durante 8 horas por lo menos, luego con un cepillo, se terminan de lavar y se enjuagan con agua corriente.

Enseguida, se enjuagan con acetona químicamente pura y con agua destilada, se hace correr la acetona. Se coloca en un horno, todo el material a una temperatura de 130°C. y se guarda posteriormente, en lugares especiales muy limpios.

La acetona, disuelve trazas de grasa y si en caso ya se ha trabajado con insecticidas, disuelve los vestigios de éstos, pudiendo trabajar con confianza, con otros o los mismos pesticidas.

El calor, termina de hacer lo que los dos primeros pasos no hicieron.

### B-Solventes.

Los solventes pueden tener como impurezas, -- otros solventes u otras sustancias, que por ser solubles, están presentes en ellos y para eso se destilan todos -- líquidos por reflujo, teniendo en cuenta su punto de ebullición exacto llevando poco a poco la elevación de temperatura hasta llegar a un grado menos del punto de ebullición de la sustancia. Descartar los primeros 100 cc de destilado y desde allí comenzar a coleccionar, no sin antes inyectar el cromatógrafo, un pequeño volumen y esperar una respuesta, carente de picos extraños, porque -- de lo contrario se vuelve a destilar.

Del frasco que contiene este destilado, se toman las porciones que se van a utilizar en recipientes -- limpios y se descarta el sobrante, nunca introducir nada, ni pipetas limpias, dentro del frasco que contiene el -- solvente para no contaminarlo.

### C-Agua.

El agua destilada y desionizada, se lava con un solvente destilado, es decir, calidad Nanogrado, en la forma descrita anteriormente, tomando un volumen  $\pm$  2-litros en un embudo separador, agregar unos 100 cc. de solvente puro y agitar vigorosamente, durante unos minutos. Se deja reposar, se colecciona el agua y se descarta el solvente.

Esta agua está lista para usar, y se conocerá como agua destilada y lavada o extraída.

#### D-Solutos.

La mayoría de solutos utilizados en cromatografía son sales con las que se harán soluciones en  $H_2O$  en solventes orgánicos o se empacarán columnas, éstas, si no vienen garantizadas por el productor, se lavan con un solvente ya tratado y se ponen al horno a secar, es decir, se recristaliza.

Si éstos se han de disolver en  $H_2O$ , se utilizará  $H_2O$ , destilada y lavada para estar seguros de la no contaminación.



E-Algodón de Vidrio.

Este sirve para taponar las columnas, y se extrae o se lava en Soxhlet con un solvente de reconocida - pureza, por unas horas, descartando el solvente.

Tomando en cuenta estos factores, podremos estar seguros, de que en nuestros análisis con cromatogra--fía de gases no tendremos respuestas, ni resultados dudo--sos.

## R E S U L T A D O S

Método No. 1.

Una vez sometidos a Fluorometría las tiras de papel Cromatográfico, (figuras Nos. 3 al 10) se observaron la presencia de determinado número de picos, (cuadros Nos. 1 al 8) en la respuesta del Fluorómetro, los cuales se identificaron con las letras A, B, C y D en los que se muestra que el pico C, aumenta notoriamente en la respuesta que corresponde a las larvas resistentes, cosa que se comprueba, comparándolos con la gráfica que corresponde a la respuesta de las larvas susceptibles verificados ambas en la misma fecha y hora.

Método No. 2.

Aunque la composición de cada una de las muestras, interfirió un poco en el procedimiento analítico, observamos los siguientes resultados:

10. En el área donde se tomaron las muestras de H<sub>2</sub>O, podemos notar gran concentración

y persistencia del compuesto, en el estero de Ticuiziapa, (Tabla No. 10) la cual posteriormente baja por dilución con agua con la que es alimentado el estero por algunos ríos.

En el cuadro No. 9 observamos las concentraciones del extracto de agua que pertenecen al río El Tunco, en el cual el compuesto, persiste únicamente 45 minutos, cosa que no sucede con el follaje, es decir zacate y hojas de caña de azúcar, (tabla No. 9) sí se notó un poco más de persistencia, pero tenía menos cantidad las muestras de zacate por tener menos altura que la caña de azúcar.

### Método No. 3.

Se sabe que el DDT es una mezcla de los isómeros op DDE, pp DDE, op DDT y pp DDT de los cuales el pp DDT es el más estable y con el cual se hace un standard.

De este standard se hace una inyección al cromatógrafo de un volumen igual, al volumen que de las



muestras se ha de inyectar. El pico resultante de las muestras, aparecerá al mismo tiempo o distancia de su inyección, con que apareció el pico del standard, (cuadros Nos. 13 y 14).

Observando estas respuestas se verá que si inyectamos cantidades iguales de los diversos extractos, la respuesta en el grabador, fue, que el pico para el pp DDT fue más pronunciado en la capa que corresponde a los zancudos resistentes, (cuadro No. 13), en consecuencia, habrá mucho más cantidad de insecticida, cosa contraria sucede con la cepa de zancudos susceptibles (cuadro No. 14) pues la cantidad de insecticida encontrado fue menor.

#### Método No. 4.

Tomando en cuenta, la velocidad del viento, la humedad ambiental, factores que influyen notablemente en el insecticida y la absorción de éste, en las superficies en donde se ha aplicado, la cantidad que volatilizó, fue bastante reducida, principalmente en la primera aplicación, (cuadros Nos. 15, 16 y 17).

Ya para la segunda aplicación hubo más dispo-

ribilidad de materia gaseosa proveniente del insecticida, la cual fue disminuyendo a medida que pasaba el tiempo, aumentando esta volatilidad, cuando el medio ambiente -- era húmedo como se ve en la tabla 11, la diferencia en -- las concentraciones.

T A B L A No. 1

0.0	<u>0</u>	13.0	<u>24</u>	26.0	<u>28</u>
0.5	<u>0</u>	13.5	<u>17</u>	26.5	<u>    </u>
1.0	<u>0</u>	14.0	<u>11</u>	27.0	<u>    </u>
1.5	<u>0</u>	14.5	<u>9.5</u>	27.5	<u>    </u>
2.0	<u>0</u>	15.0	<u>12.5</u>	28.0	<u>    </u>
2.5	<u>0</u>	15.5	<u>14.12.5</u>	28.5	<u>    </u>
3.0	<u>7</u>	16.0	<u>15</u>	29.0	<u>    </u>
3.5	<u>10</u>	16.5	<u>17</u>	29.5	<u>    </u>
4.0	<u>8.5</u>	17.0	<u>22</u>	30.0	<u>    </u>
4.5	<u>8.5</u>	17.5	<u>27</u>	30.5	<u>    </u>
5.0	<u>11.5</u>	18.0	<u>30.5</u>	31.0	<u>    </u>
5.5	<u>10</u>	18.5	<u>29</u>	31.5	<u>    </u>
6.0	<u>10</u>	19.0	<u>24</u>	32.0	<u>    </u>
6.5	<u>10</u>	19.5	<u>20</u>	32.5	<u>    </u>
7.0	<u>12</u>	20.0	<u>16</u>	33.0	<u>    </u>
7.5	<u>17</u>	20.5	<u>17</u>	33.5	<u>    </u>
8.0	<u>19</u>	21.0	<u>16.5</u>	34.0	<u>    </u>
8.5	<u>17</u>	21.5	<u>17</u>	34.5	<u>    </u>
9.0	<u>16</u>	22.0	<u>19</u>	35.0	<u>    </u>
9.5	<u>12.5</u>	22.5	<u>21</u>	35.5	<u>    </u>
10.0	<u>11.5</u>	23.0	<u>21</u>	36.0	<u>    </u>
10.5	<u>11.5</u>	23.5	<u>21</u>		
11.0	<u>11.6</u>	24.0	<u>22</u>		
11.5	<u>23</u>	24.5	<u>22</u>		
12.0	<u>26</u>	25.0	<u>23</u>		
12.5	<u>27.5</u>	25.0	<u>25</u>		

Collection: Susceptible

Fecha: 2 - 2 - 71

30  
29  
28  
27  
26  
25  
24  
23  
22  
21  
20  
19  
18  
17  
16  
15  
14  
13  
12  
11  
10  
9  
8  
7  
6  
5  
4  
3  
2  
1

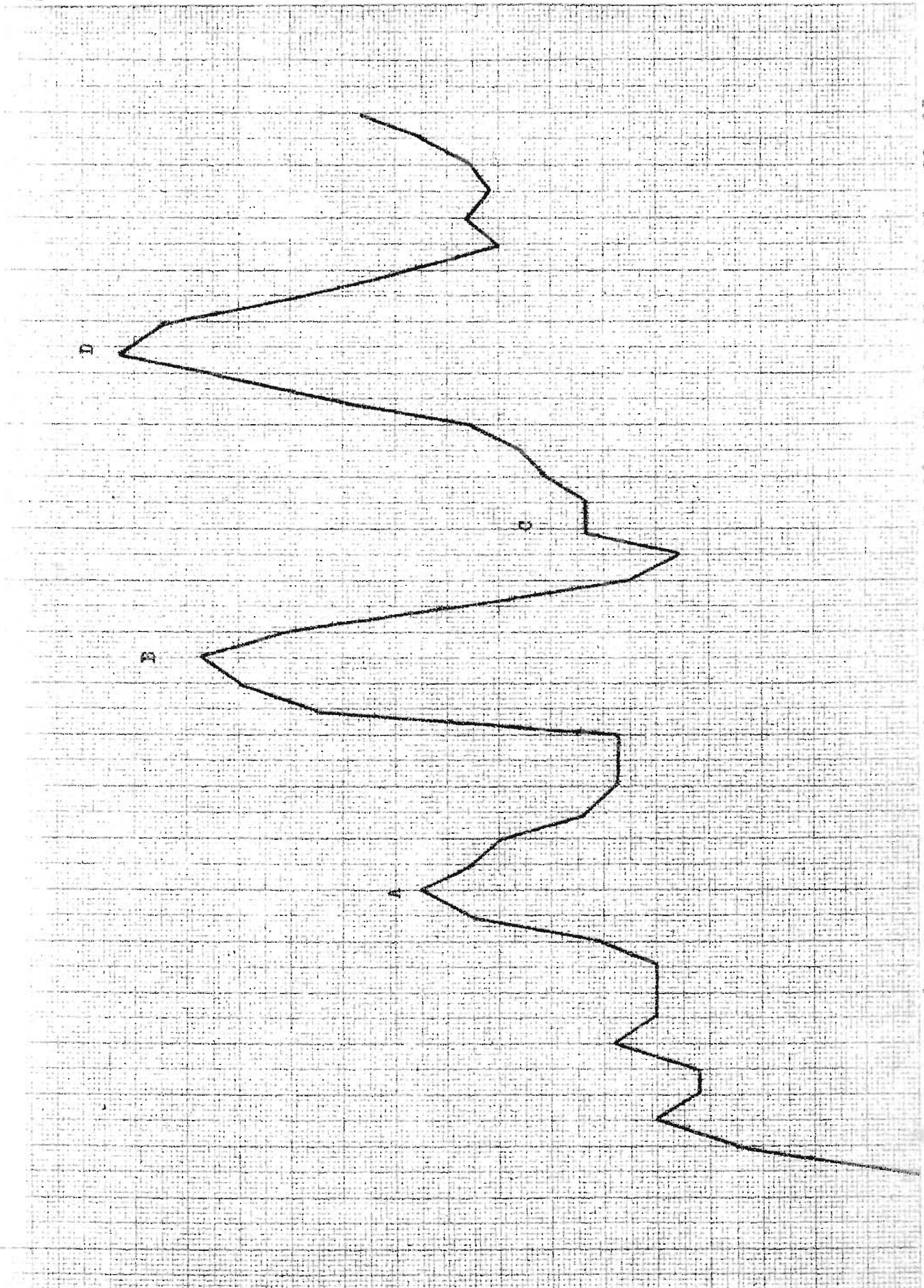
D

B

C

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

Miscellaneous Susceptible

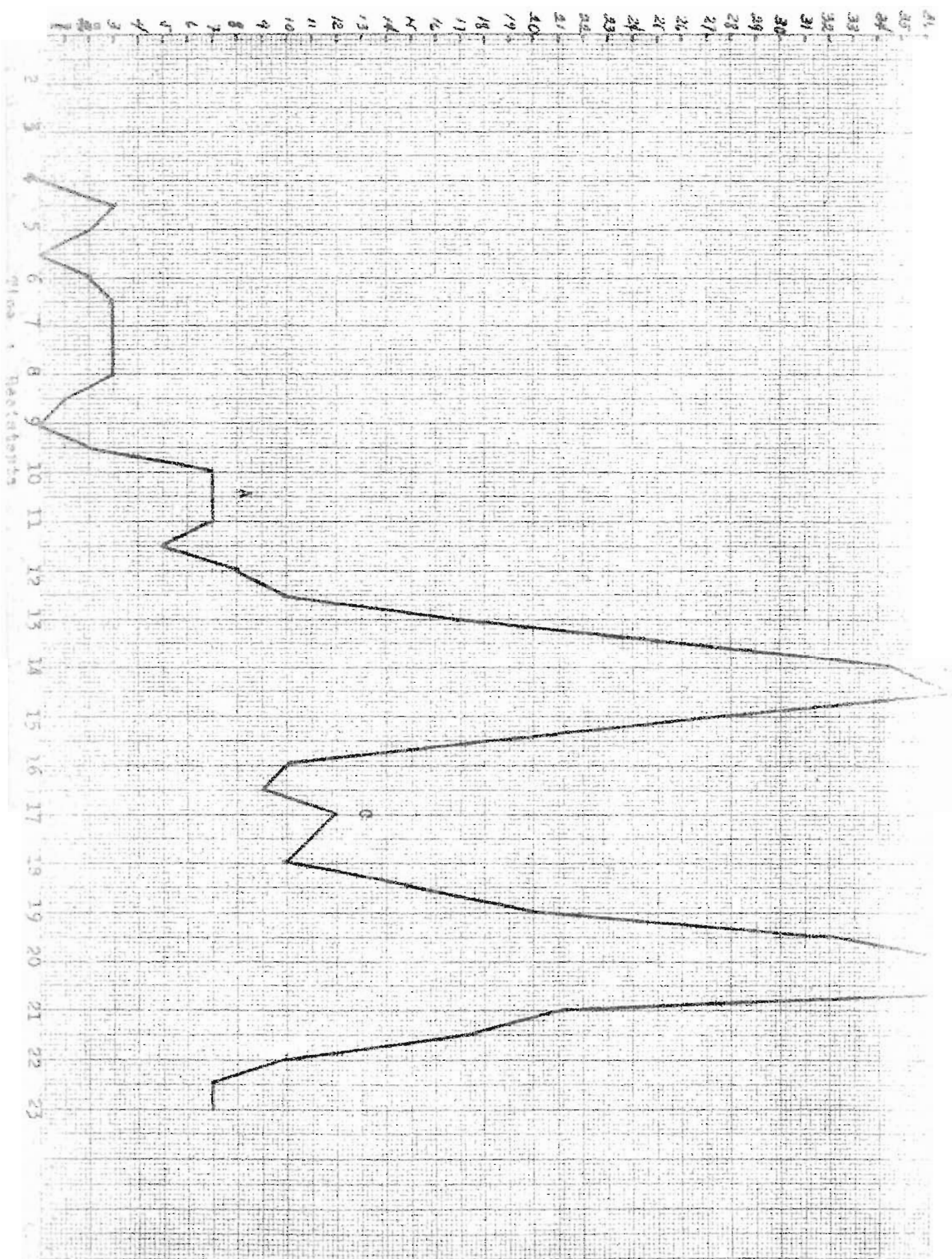


T A B L A No. 2

0.0	<u>      </u>	12.0	<u>8.0</u>	24.0	<u>8.0</u>
05.	<u>      </u>	12.5	<u>10.0</u>	24.5	<u>8.0</u>
1.0	<u>0</u>	13.0	<u>17.0</u>	25.0	<u>11.0</u>
1.5	<u>0</u>	13.5	<u>26.0</u>	25.5	<u>11.0</u>
2.0	<u>      </u>	14.0	<u>      </u>	26.0	<u>11.0</u>
2.5	<u>0</u>	14.5	<u>36.0</u>	26.5	<u>11.0</u>
3.0	<u>0</u>	15.0	<u>28.0</u>	27.0	<u>14.0</u>
3.5	<u>0</u>	15.5	<u>19.0</u>	27.5	<u>13.0</u>
4.0	<u>0</u>	16.0	<u>10.0</u>	28.0	<u>18.0</u>
4.5	<u>3.0</u>	16.5	<u>9.0</u>	28.5	<u>21.0</u>
5.0	<u>2.0</u>	17.0	<u>12.0</u>	29.0	<u>24.0</u>
5.5	<u>0</u>	17.5	<u>11.0</u>	30.0	<u>27.0</u>
6.0	<u>2.0</u>	18.0	<u>10.0</u>	30.5	<u>29.0</u>
6.5	<u>3.0</u>	18.5	<u>15.0</u>	31.0	<u>34.0</u>
7.0	<u>3.0</u>	19.0	<u>21.0</u>	31.5	<u>42.0</u>
7.5	<u>3.0</u>	19.5	<u>31.0</u>	32.0	<u>      </u>
8.0	<u>3.0</u>	20.0	<u>39.0</u>	32.5	<u>      </u>
8.5	<u>1.0</u>	20.5	<u>41.0</u>	33.0	<u>      </u>
9.0	<u>0.0</u>	21.0	<u>22.0</u>	33.5	<u>      </u>
9.5	<u>2.0</u>	21.5	<u>17.5</u>	34.0	<u>      </u>
10.0	<u>7.0</u>	22.0	<u>10.0</u>	34.5	<u>      </u>
10.5	<u>7.0</u>	22.5	<u>7.0</u>	35.0	<u>      </u>
11.0	<u>7.0</u>	23.0	<u>7.0</u>	35.0	<u>      </u>
11.5	<u>5.0</u>	23.5	<u>7.0</u>	36.0	<u>      </u>

Collection No. 2 - R

Fecha: 2/2/71.

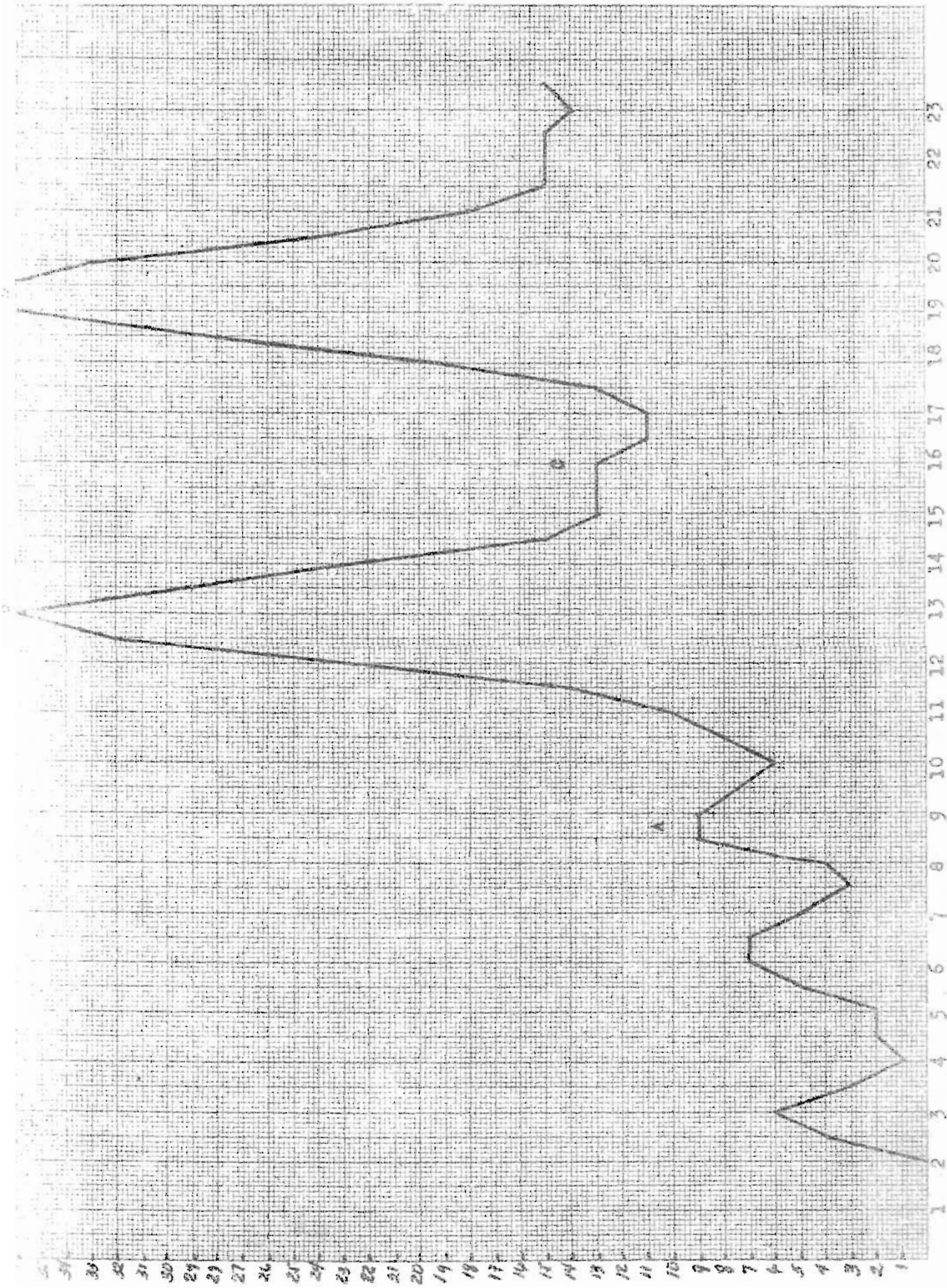


T A B L A No. 3

0.0 _____	12.0 _____ 22.0	24.0 _____ 22.0
0.5 _____	12.5 _____ 32.0	24.5 _____ 27.0
1.0 _____	13.0 _____ 36.0	25.0 _____ 31.0
1.5 _____	13.5 _____ 29.0	25.5 _____ 36.0
2.0 _____ 0.0	14.0 _____ 23.0	26.0 _____ 42.0
2.5 _____ 4.0	14.5 _____ 15.0	26.5 _____
3.0 _____ 6.0	15.0 _____ 13.0	27.0 _____
3.5 _____ 3.0	15.5 _____ 13.0	27.5 _____
4.0 _____ 1.0	16.0 _____ 13.0	28.0 _____
4.5 _____ 2.0	16.5 _____ 11.0	28.5 _____
5.0 _____ 2.0	17.0 _____ 11.0	29.0 _____
5.5 _____ 5.0	17.5 _____ 13.0	30.0 _____
6.0 _____ 7.0	18.0 _____ 19.0	30.5 _____
6.5 _____ 7.0	18.5 _____ 28.0	31.0 _____
7.0 _____ 5.0	19.0 _____ 36.0	31.5 _____
7.5 _____ 3.0	19.5 _____ 41.0	32.0 _____
8.0 _____ 4.0	20.0 _____ 33.0	32.5 _____
8.5 _____ 9.0	20.5 _____ 24.0	33.0 _____
9.0 _____ 9.0	21.0 _____ 18.0	33.5 _____
9.5 _____ 7.0	21.5 _____ 15.0	34.0 _____
10.0 _____ 6.0	22.0 _____ 15.0	34.5 _____
10.5 _____ 8.0	22.5 _____ 15.0	35.0 _____
11.0 _____ 10.0	23.0 _____ 14.0	35.5 _____
11.5 _____ 14.0	23.5 _____ 15.0	36.0 _____

Collectio: 50 ul. I-S

Fecha: 20/4/71.



Delocifm : Sarcophila  
 1911

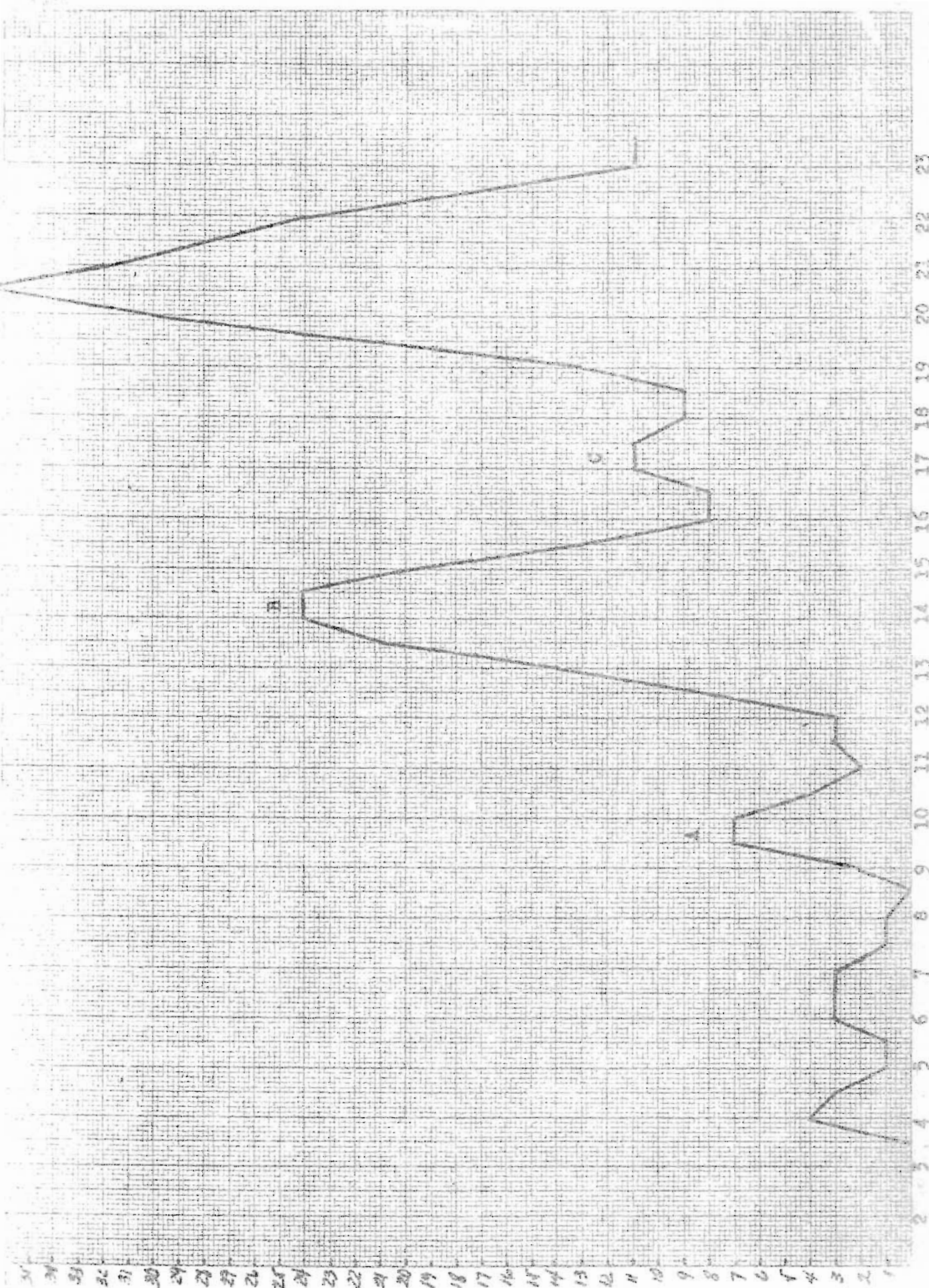


T A B L A No. 4

0.0 _____	12.0 _____ 3.0	24.0 _____ 13.0
0.5 _____	12.5 _____ 8.0	24.5 _____ 15.0
1.0 _____	13.0 _____ 14.0	25.0 _____ 15.0
1.5 _____ 0	13.5 _____ 21.0	25.5 _____ 16.0
2.0 _____ 0	14.0 _____ 24.0	26.0 _____ 18.0
2.5 _____ 0	14.5 _____ 24.0	26.5 _____ 21.0
3.0 _____ 0	15.0 _____ 20.0	27.0 _____ 24.0
3.5 _____ 0	15.5 _____ 13.0	27.5 _____ 26.0
4.0 _____ 4.0	16.0 _____ 8.0	28.0 _____ 26.0
4.5 _____ 3.0	16.5 _____ 8.0	28.5 _____ 32.0
5.0 _____ 1.0	17.0 _____ 11.0	29.0 _____ 41.0
5.5 _____ 1.0	17.5 _____ 11.0	30.0 _____ 29.5
6.0 _____ 3.0	18.0 _____ 9.0	30.5 _____
6.5 _____ 3.0	18.5 _____ 9.0	31.0 _____
7.0 _____ 3.0	19.0 _____ 13.5	31.5 _____
7.5 _____ 1.0	19.5 _____ 21.0	32.0 _____
8.0 _____ 1.0	20.0 _____ 30.0	32.5 _____
8.5 _____ 0	20.5 _____ 37.0	33.0 _____
9.0 _____ 2.0	21.0 _____ 32.0	33.5 _____
9.5 _____ 7.0	21.5 _____ 24.0	34.0 _____
10.0 _____ 7.0	22.0 _____ 16.0	34.5 _____
10.5 _____ 4.0	22.5 _____ 11.0	35.0 _____
11.0 _____ 2.0	23.0 _____ 11.0	35.5 _____
11.5 _____ 3.0	23.5 _____ 13.0	36.0 _____

Collection: II - R

Fecha: 20/4/71.



Colocação: Assistente  
 Pochá: 20 de Abril de 1971

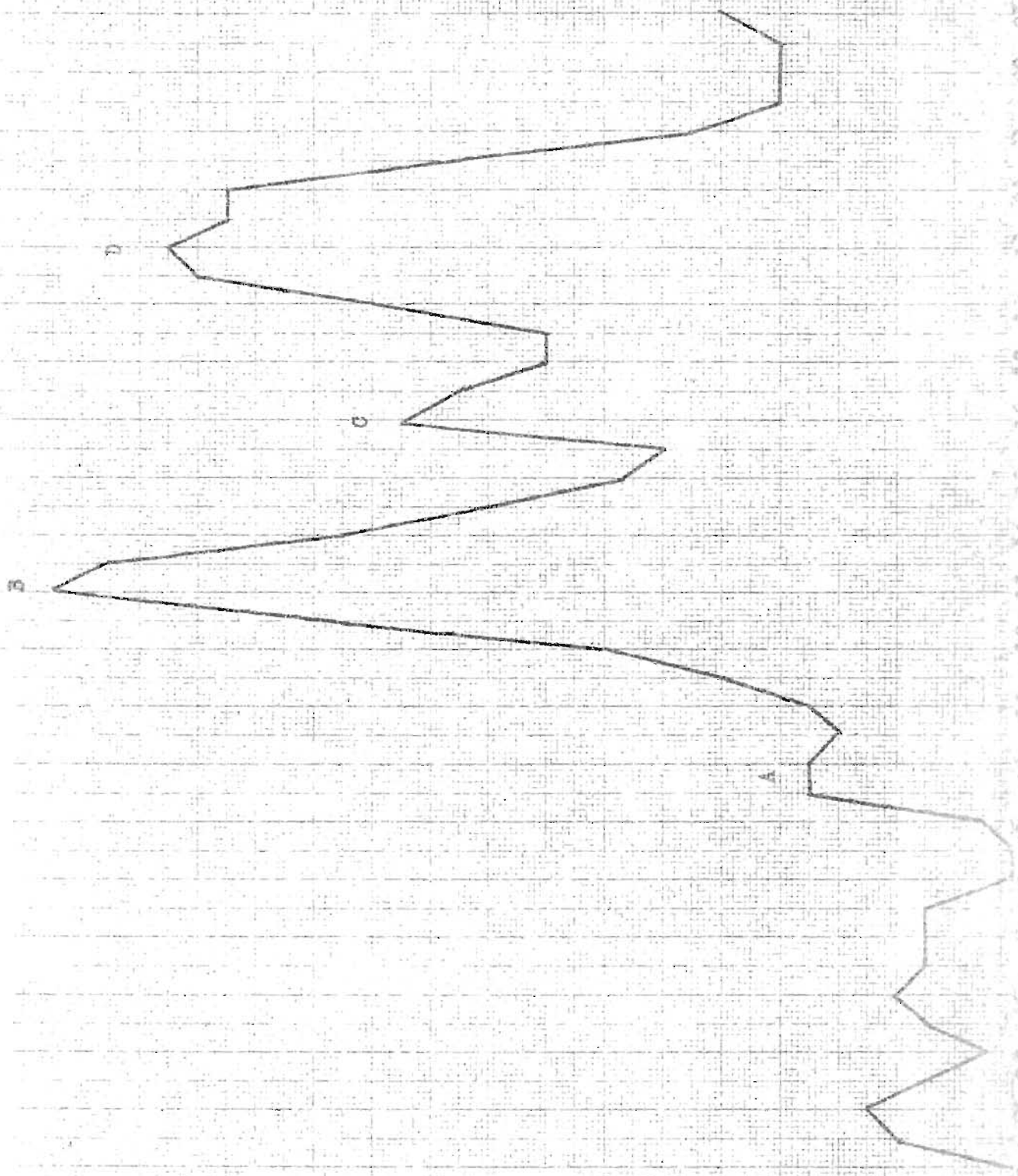
T A B L A No. 5

0.0	_____	12.0	_____14	24.0	_____10
0.5	_____	12.5	_____23	24.5	_____11
1.0	_____0	13.0	_____33	25.0	_____13
1.5	_____0	13.5	_____31	25.5	_____14
2.0	_____0	14.0	_____23	26.0	_____14
2.5	_____0	14.5	_____16	26.5	_____15
3.0	_____0	15.0	_____13	27.0	_____16
3.5	_____4	15.5	_____12	27.5	_____20
4.0	_____5	16.0	_____21	28.0	_____20
4.5	_____2.5	16.5	_____19	28.5	_____22.0
5.0	_____1	17.0	_____16	29.0	_____23.0
5.5	_____3	17.5	_____16	30.0	_____29.5 28
6.0	_____4	18.0	_____22	30.5	_____37.0
6.5	_____3	18.5	_____28	31.0	_____
7.0	_____3	19.0	_____29	31.5	_____
7.5	_____3	19.5	_____27	32.0	_____
8.0	_____0	20.0	_____27	32.5	_____
8.5	_____0	20.5	_____19	33.0	_____
9.0	_____1	21.0	_____11	33.5	_____
9.5	_____7	21.5	_____8	34.0	_____
10.0	_____7	22.0	_____8	34.5	_____
10.5	_____6	22.5	_____8	35.0	_____
11.0	_____7	23.0	_____10	35.5	_____
11.5	_____10	23.5	_____10	36.0	_____

Collection: No. 1---S

Fecha: 7/7/71.

36 -  
35 -  
34 -  
33 -  
32 -  
31 -  
30 -  
29 -  
28 -  
27 -  
26 -  
25 -  
24 -  
23 -  
22 -  
21 -  
20 -  
19 -  
18 -  
17 -  
16 -  
15 -  
14 -  
13 -  
12 -  
11 -  
10 -  
9 -  
8 -  
7 -  
6 -  
5 -  
4 -  
3 -



36  
35  
34  
33  
32  
31  
30  
29  
28  
27  
26  
25  
24  
23  
22  
21  
20  
19  
18  
17  
16  
15  
14  
13  
12  
11  
10  
9  
8  
7  
6  
5  
4  
3

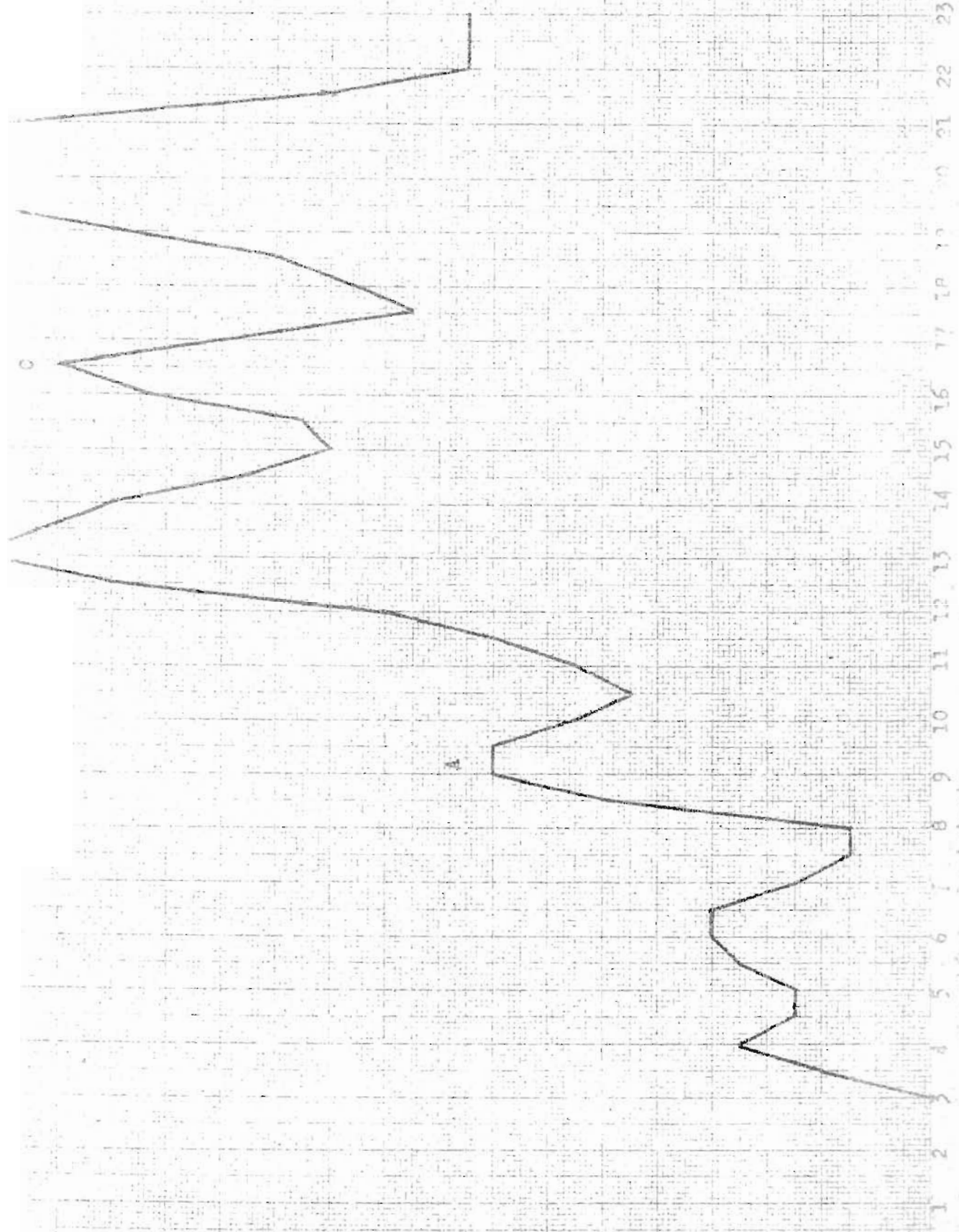
T A B L A No. 6

0.0	12.0	24.0
0.5	12.5	24.5
1.0	13.0	25.0
1.5	13.5	25.5
2.0	14.0	26.0
2.5	14.5	26.5
3.0	15.0	27.0
3.5	15.5	27.5
4.0	16.0	28.0
4.5	16.5	28.5
5.0	17.0	29.0
5.5	17.5	29.5
6.0	18.0	30.0
6.5	18.5	30.5
7.0	19.0	31.0
7.5	19.5	31.5
8.0	20.0	32.0
8.5	20.5	32.5
9.0	21.0	33.0
9.5	21.5	33.5
10.0	22.0	34.0
10.5	22.5	34.5
11.0	23.0	35.0
11.5	23.5	35.0

Collection: No. 2 R

Fecha: 7/5/71.

39  
38  
37  
36  
35  
34  
33  
32  
31  
30  
29  
28  
27  
26  
25  
24  
23  
22  
21  
20  
19  
18  
17  
16  
15  
14  
13  
12  
11  
10  
9  
8  
7  
6  
5  
4  
3  
2  
1



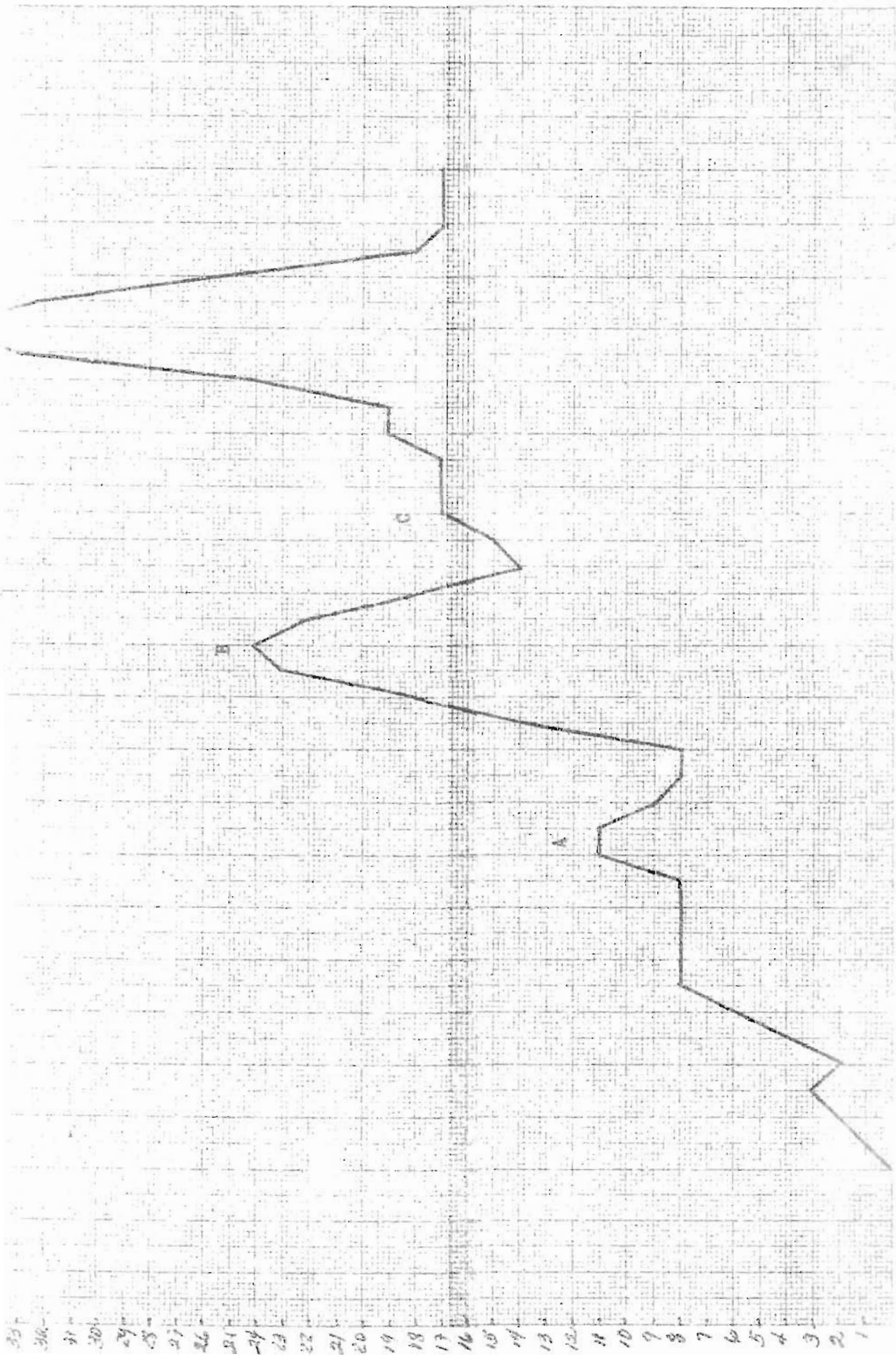
Assistente

T A B L A No. 7

0.0 _____	12.5 <u>14.0</u>	25.0 <u>31.0</u>
0.5 _____	13.0 <u>18.0</u>	25.5 <u>33.0</u>
1.0 _____	13.5 <u>23.0</u>	26.0 <u>37.0</u>
1.5 _____	14.0 <u>24.0</u>	26.5 _____
2.0 _____	14.5 <u>22.0</u>	27.0 _____
2.5 _____	15.0 <u>18.0</u>	27.5 _____
3.0 _____	15.5 <u>14.0</u>	28.0 _____
3.5 _____	16.0 <u>15.0</u>	28.5 _____
4.0 <u>0.0</u>	16.5 <u>17.0</u>	29.0 _____
4.5 <u>1.0</u>	17.0 <u>17.0</u>	29.5 _____
5.0 <u>2.0</u>	17.5 <u>17.0</u>	30.0 _____
5.5 <u>3.0</u>	18.0 <u>19.0</u>	30.5 _____
6.0 <u>2.0</u>	18.5 <u>19.0</u>	31.0 _____
6.5 <u>4.0</u>	19.0 <u>24.0</u>	31.5 _____
7.0 <u>6.0</u>	19.5 <u>33.0</u>	32.0 _____
7.5 <u>8.0</u>	20.0 <u>36.0</u>	32.5 _____
8.0 <u>8.0</u>	20.5 <u>32.0</u>	33.0 _____
8.5 <u>8.0</u>	21.0 <u>25.0</u>	33.5 _____
9.0 <u>8.0</u>	21.5 <u>18.0</u>	34.0 _____
9.5 <u>8.0</u>	22.0 <u>17.0</u>	34.5 _____
10.0 <u>11.0</u>	22.5 <u>17.0</u>	35.0 _____
10.5 <u>11.0</u>	23.0 <u>17.0</u>	35.5 _____
11.0 <u>9.0</u>	23.5 <u>22.0</u>	36.0 _____
11.5 <u>8.0</u>	24.0 <u>22.0</u>	
12.0 <u>8.0</u>	24.5 <u>27.0</u>	

Collection: I— S

Fecha: 20/4/71.



23  
22  
21  
20  
19  
18  
17  
16  
15  
14  
13  
12  
11  
10  
9  
8  
7  
6  
5  
4  
3  
2  
1

23  
22  
21  
20  
19  
18  
17  
16  
15  
14  
13  
12  
11  
10  
9  
8  
7  
6  
5  
4  
3  
2  
1

23  
22  
21  
20  
19  
18  
17  
16  
15  
14  
13  
12  
11  
10  
9  
8  
7  
6  
5  
4  
3  
2  
1

unavailable



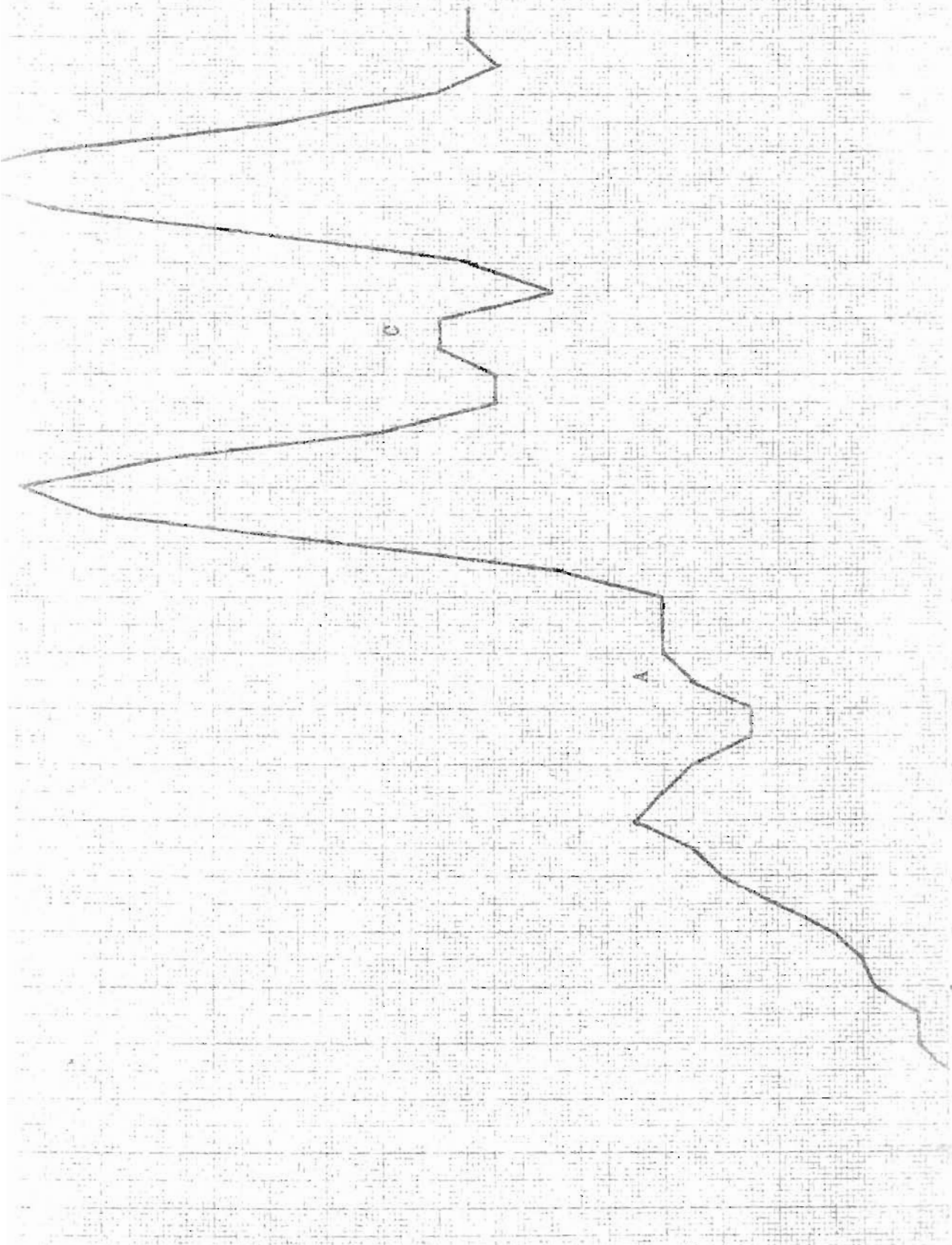
T A B L A No. 8

0.0	_____	12.5	<u>14.0</u>	25.0	<u>22.0</u>
0.5	_____	13.0	<u>18.0</u>	25.5	<u>24.0</u>
1.0	_____	13.5	<u>23.0</u>	26.0	<u>25.0</u>
1.5	_____	14.0	<u>24.0</u>	26.5	<u>27.0</u>
2.0	_____	14.5	<u>22.0</u>	27.0	<u>27.0</u>
2.5	<u>0</u>	15.0	<u>18.0</u>	27.5	<u>30.0</u>
3.0	<u>0</u>	15.5	<u>14.0</u>	28.0	<u>35.0</u>
3.5	<u>0</u>	16.0	<u>15.0</u>	28.5	<u>39.0</u>
4.0	<u>0</u>	16.5	<u>17.0</u>	29.0	_____
4.5	<u>1.0</u>	17.0	<u>17.0</u>	30.0	_____
5.0	<u>2.0</u>	17.5	<u>17.0</u>	30.5	_____
5.5	<u>3.0</u>	18.0	<u>19.0</u>	31.0	_____
6.0	<u>2.0</u>	18.5	<u>19.0</u>	31.5	_____
6.5	<u>4.0</u>	19.0	<u>24.0</u>	32.0	_____
7.0	<u>6.0</u>	19.5	<u>33.0</u>	32.5	_____
7.5	<u>8.0</u>	20.0	<u>36.0</u>	33.0	_____
8.0	<u>8.0</u>	20.5	<u>32.0</u>	33.5	_____
8.5	<u>8.0</u>	21.0	<u>25.0</u>	34.0	_____
9.0	<u>8.0</u>	21.5	<u>18.0</u>	34.5	_____
9.5	<u>8.0</u>	22.0	<u>17.0</u>	35.0	_____
10.0	<u>11.0</u>	22.5	<u>17.0</u>	35.5	_____
10.5	<u>11.0</u>	23.0	<u>17.0</u>	36.0	_____
11.0	<u>9.0</u>	23.5	<u>19.0</u>		
11.5	<u>8.0</u>	24.0	<u>19.0</u>		
12.0	<u>8.0</u>	24.5	<u>22.0</u>		

Collection: 50 ml. II - R -

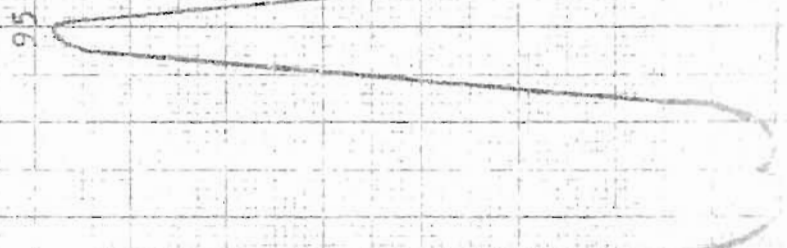
Fecha: 20/4/71.

34  
33  
31  
30  
29  
28  
27  
26  
25  
24  
23  
22  
21  
20  
19  
18  
17  
16  
15  
14  
13  
12  
11  
10  
9  
8  
7  
6  
5  
4  
3  
2  
1



34-34 8-11-1954

Standard solution 5 ml



Extracto de Agua Rio Tuncos 5 ml 12:00 M



Extracto de Agua Rio Tuncos 5 ml 12:15

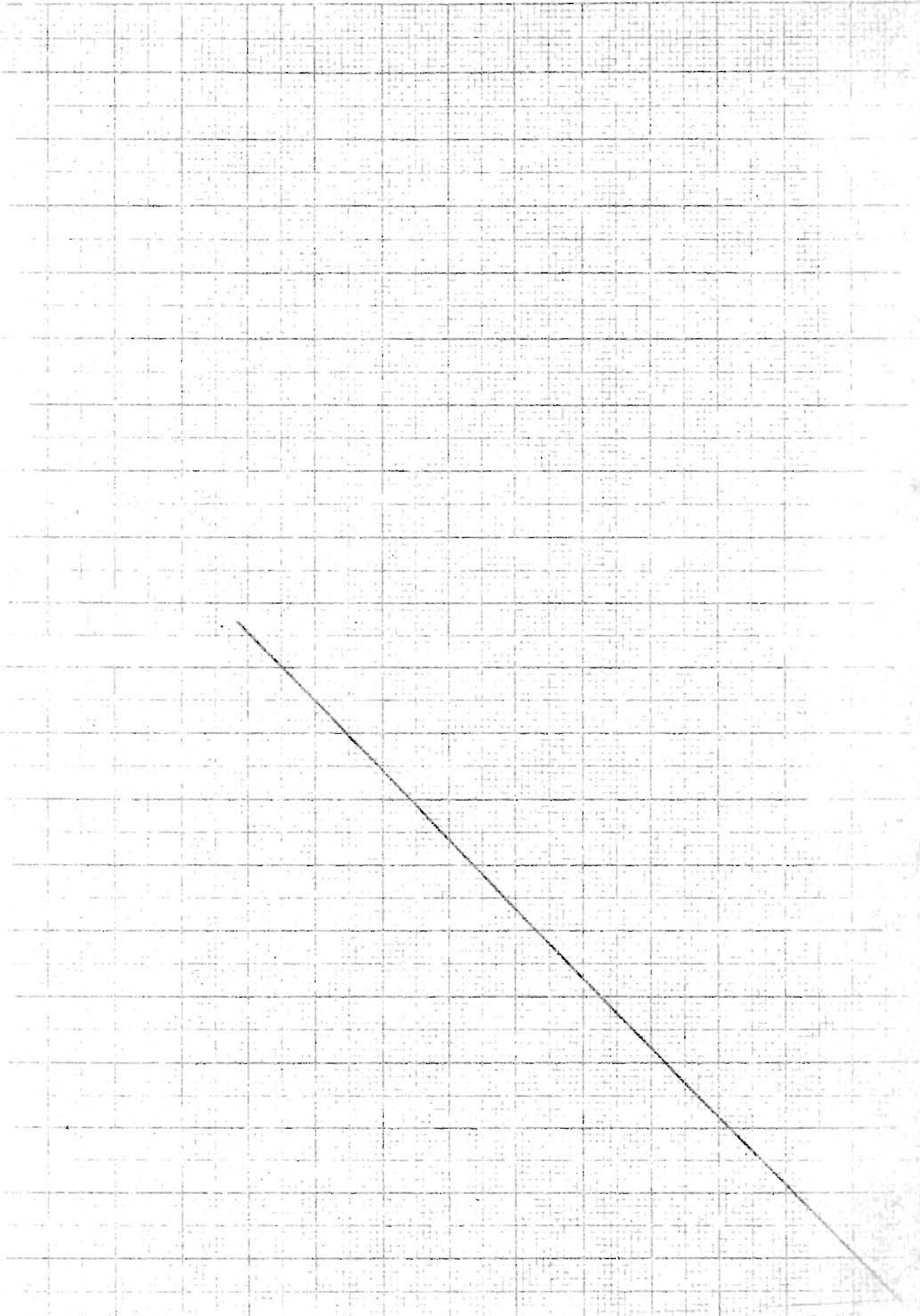


Extracto de Agua Rio Tuncos 5 ml 12:30



100  
90  
80  
70  
60  
50  
40  
30  
20  
10

Altitude



ESTADO DE CUENTAS DE LA UNIÓN DE PRODUCTORES CAFFEROS

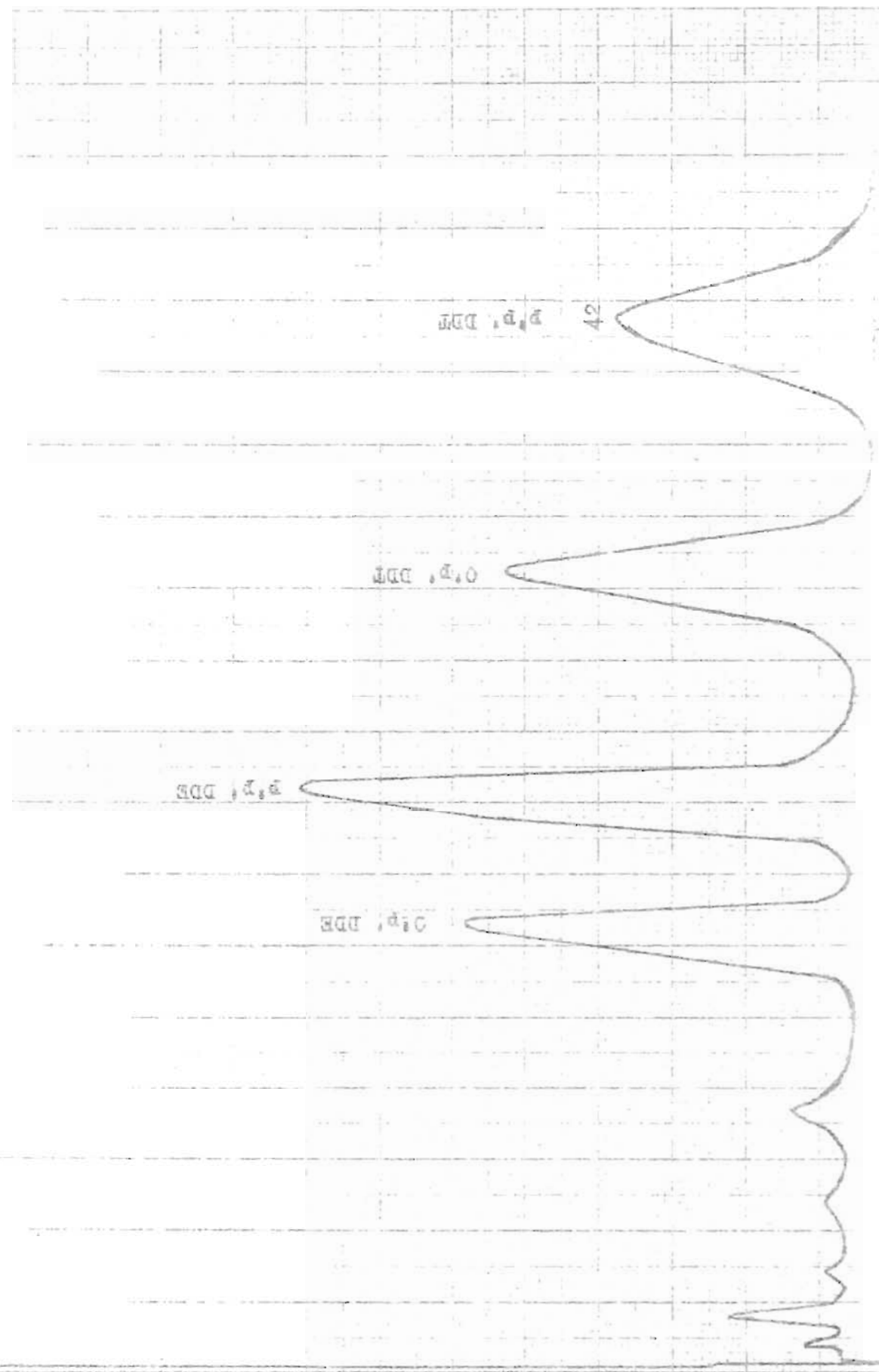
ANEXO A ( UNIV )

LOCALIZACION	CONTROL	Poros después de la Aplic.	Poros después de la Aplic.	Poros después de la Aplic.	Poros después de la Aplic.
		2-4 24 48 144	2-4 24 48 144	16 40 64 160	
Estado yerboso A	0	0.842 0.671 0.100 0.058	1.057 1.640 0.141	41.262 6.455 2.500 0.221	
Estado yerboso B	0	0.102 1.000 0.140 0.074	6.225 1.000 3.030 1.362	31.513 19.302 8.927 3.214	
Hoja de café de Alfaro	0	36.375 3.924 1.240 1.045	31.075 5.940 1.060 2.722	68.150 40.000 25.124 7.307	

VALORES RESERVADOS RELEVADOS EN LAS DE MALATHION EN VARIAS ESTACIONES DE DIFERENTES RIOS.

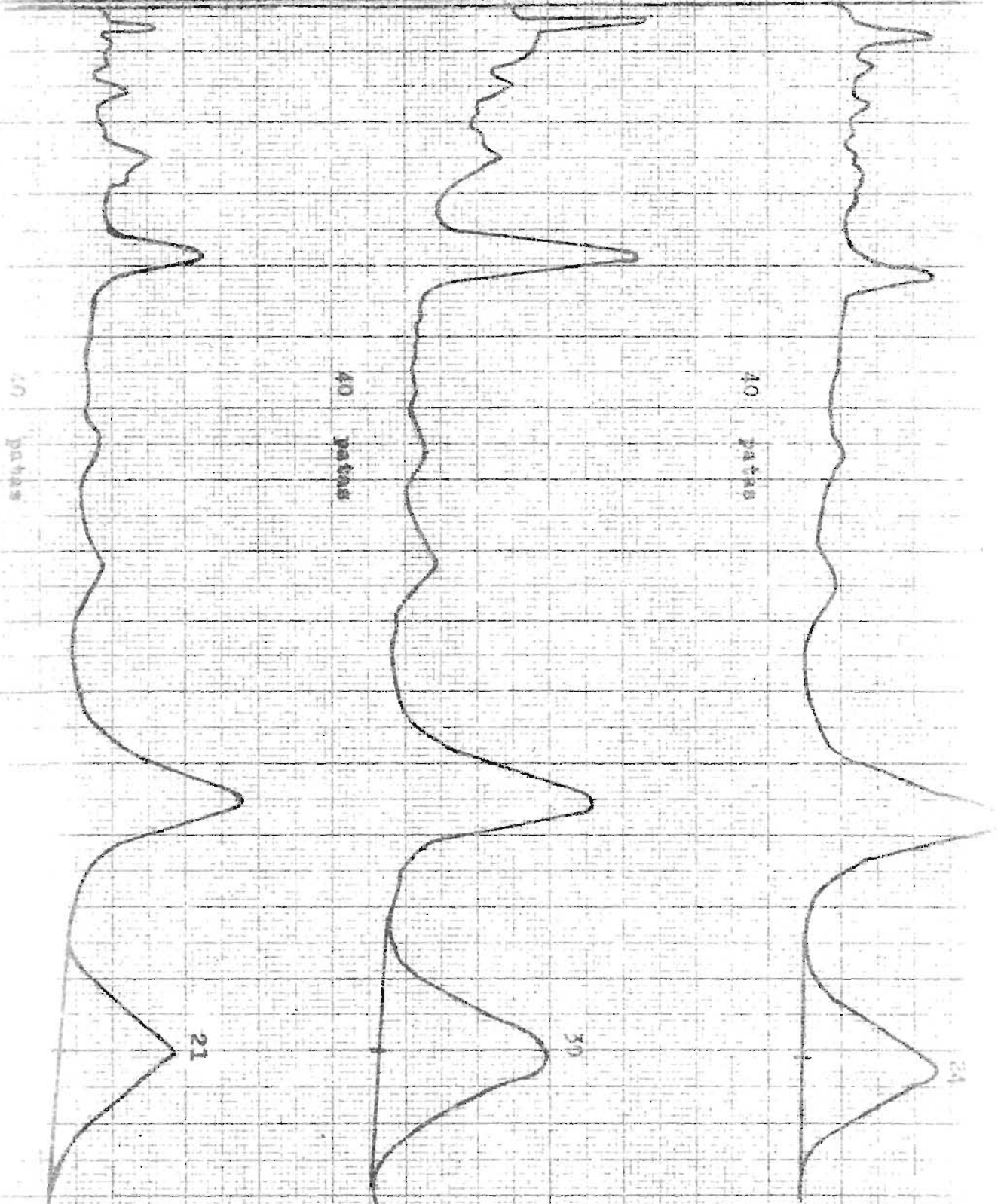
SECCION DE LA INVESTIGACION DE LA CONTAMINACION ( DIV ) 3 ANOS. 1 ACHO

LOCALIZACION	CONTROL	Horas Servicio 1e. Aplic.	Horas Servicio 2e. Aplic.	Horas Servicio 3e. Aplic.
		2-4 14 40 144	2-4 24 48 144	2-4 24 48 144
Estero Tiquizapa	0	0 0 0 0	8 2 0 0	4 2 1 0
Estación 1	0	27 3 0 0	25 3 2 0	1 1 0 0
Estación 2	0	90 13 0 0	50 6 2 0	9 4 2 0
Estación 3	0	82 17 6 0	27 11 4 0	13 6 2 0
Estación 4	0	18 3 0 0	6 3 0 0	0 0 2 0
Rio El Jute	0	8 0 0 0	0 0 0 0	8 3 0 0
Rio San Antoni.	0	26 0 0 0	12 1 0 0	4 1 0 0
Rio Acufeculillo	0	8 0 0 0	10 0 0 0	Insuficiencia de agua.



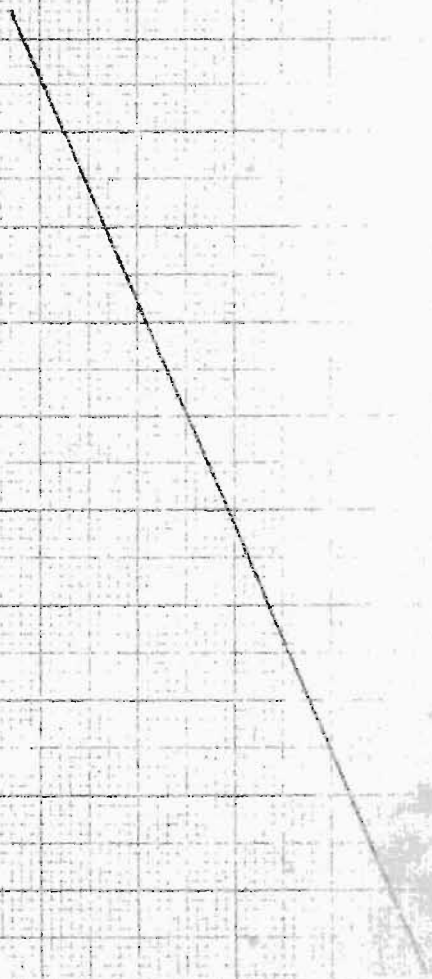
Altura en cm.

5 ul de extracto



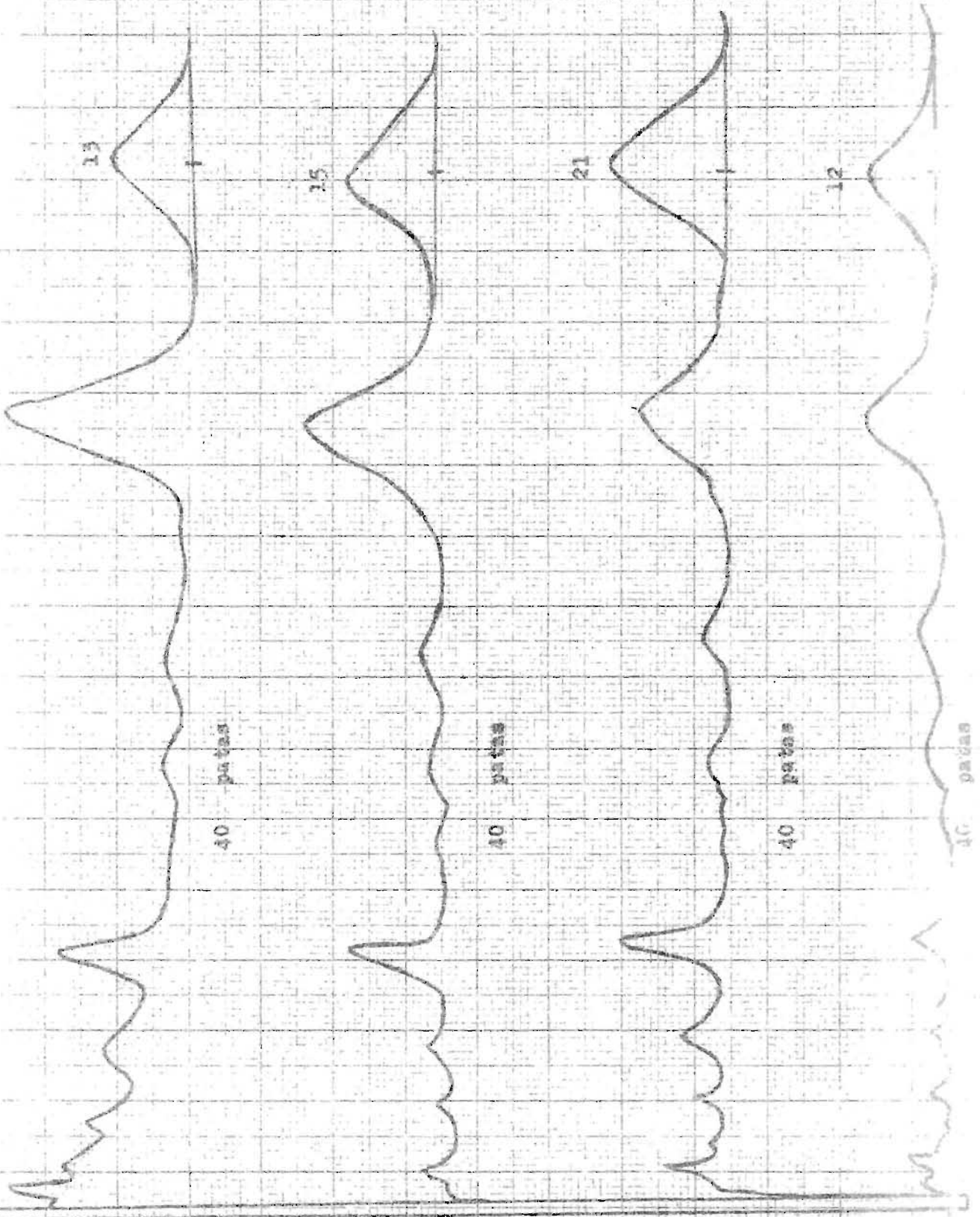


50 40 30 20 10 0



Altura

5 ml de extracto



24  
2  
25

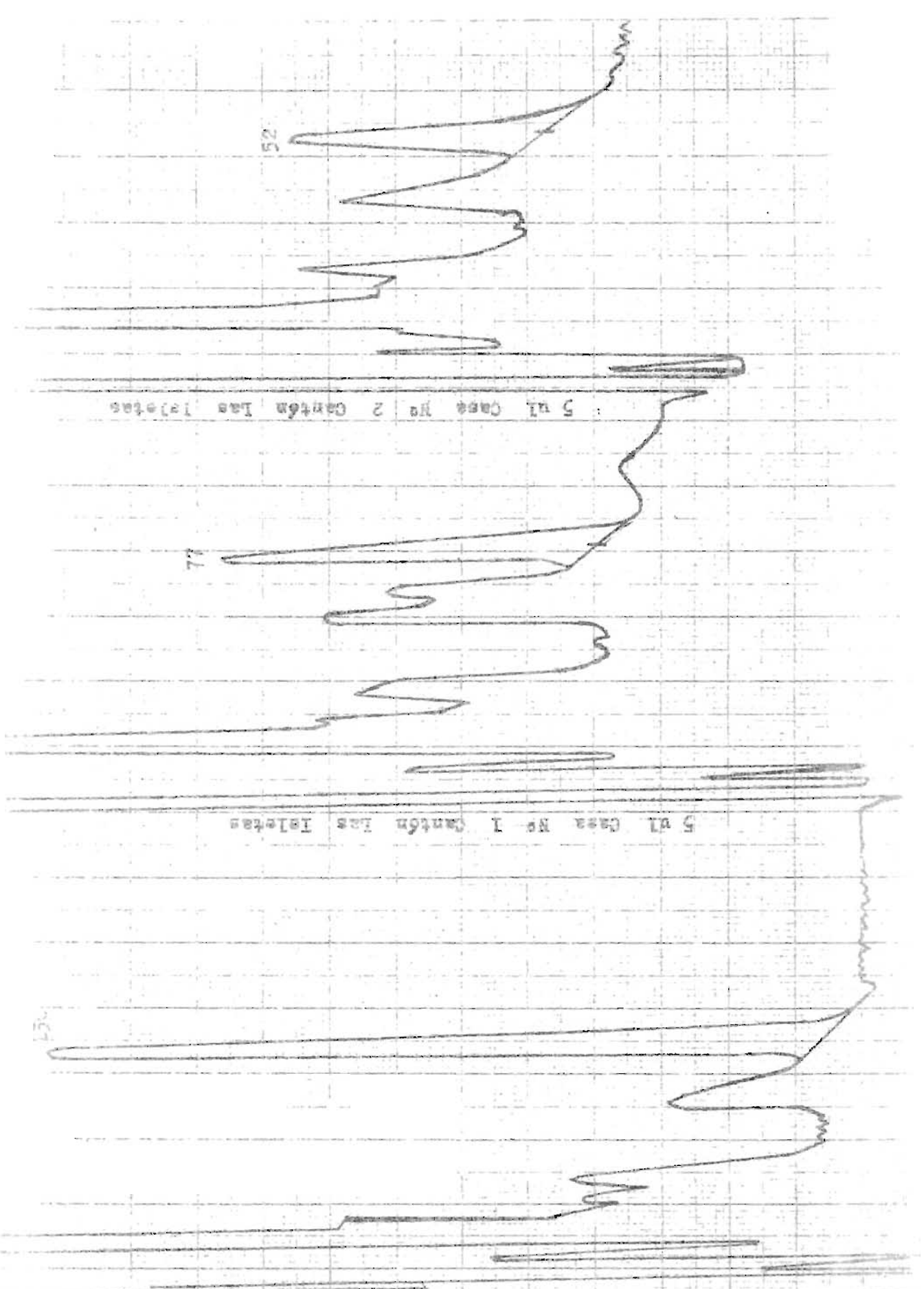
5 ul Case No 2 Canton Las Teletas

71

5 ul Case No 1 Canton Las Teletas

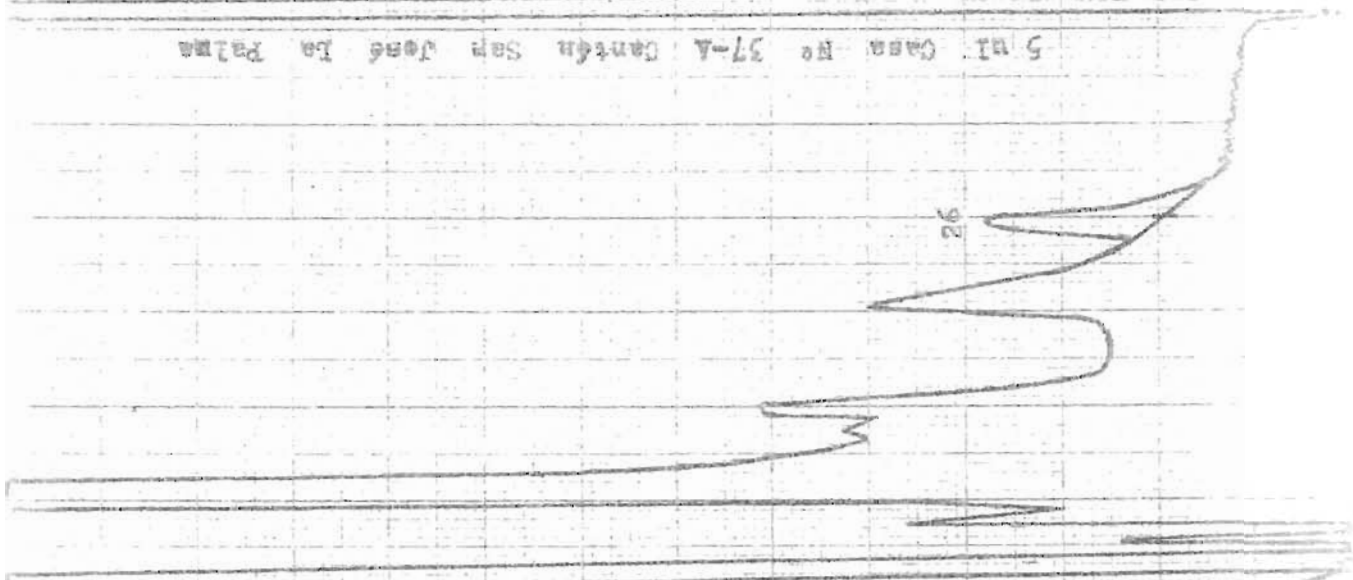
150

Altura  
ul Standard CMS 33  
10/ VII / 71

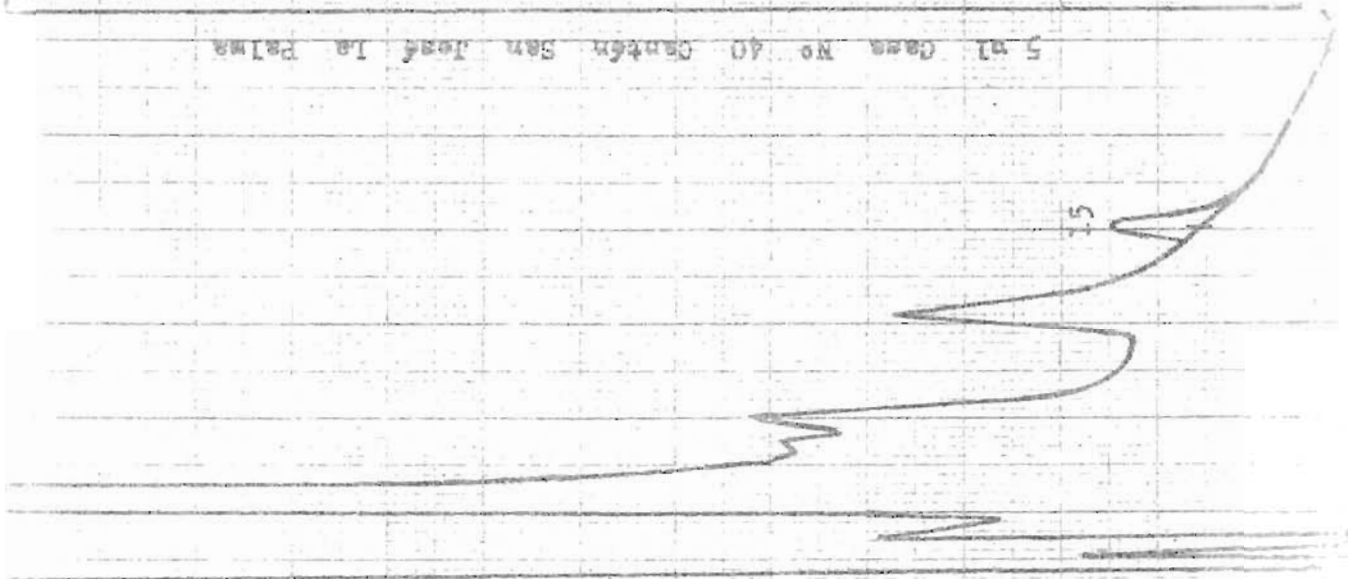


Altura

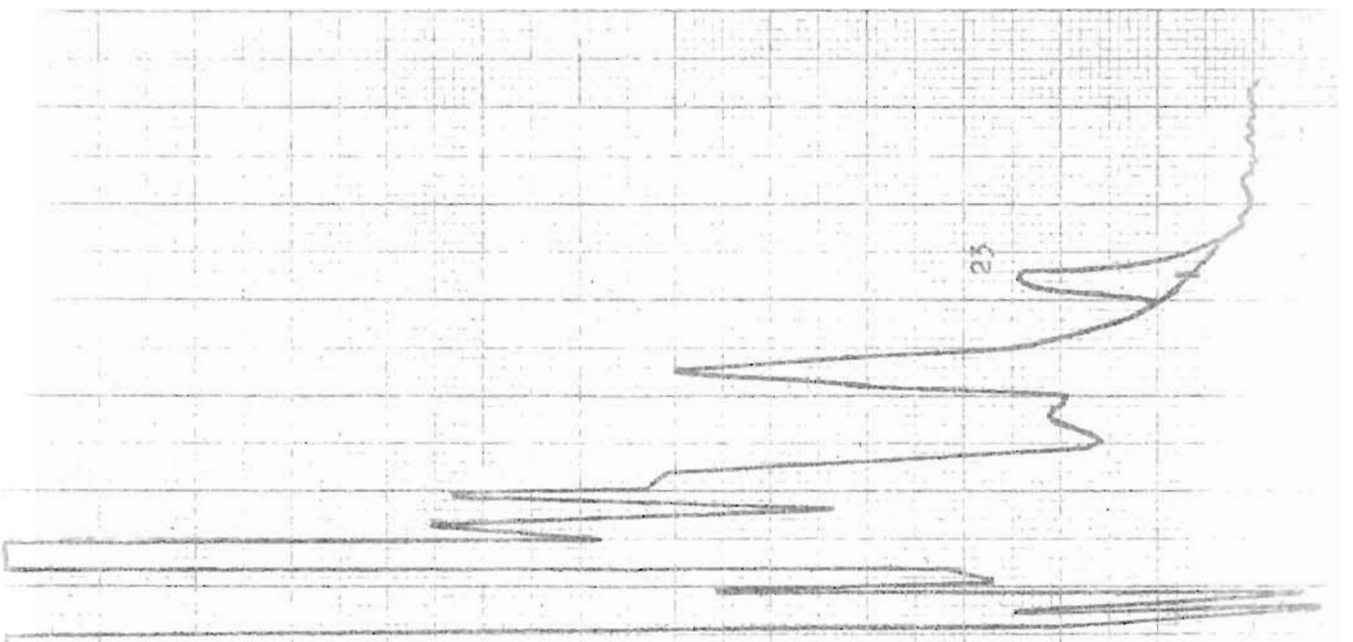
5 ml Gasas No 3 Cantón Las Isletas



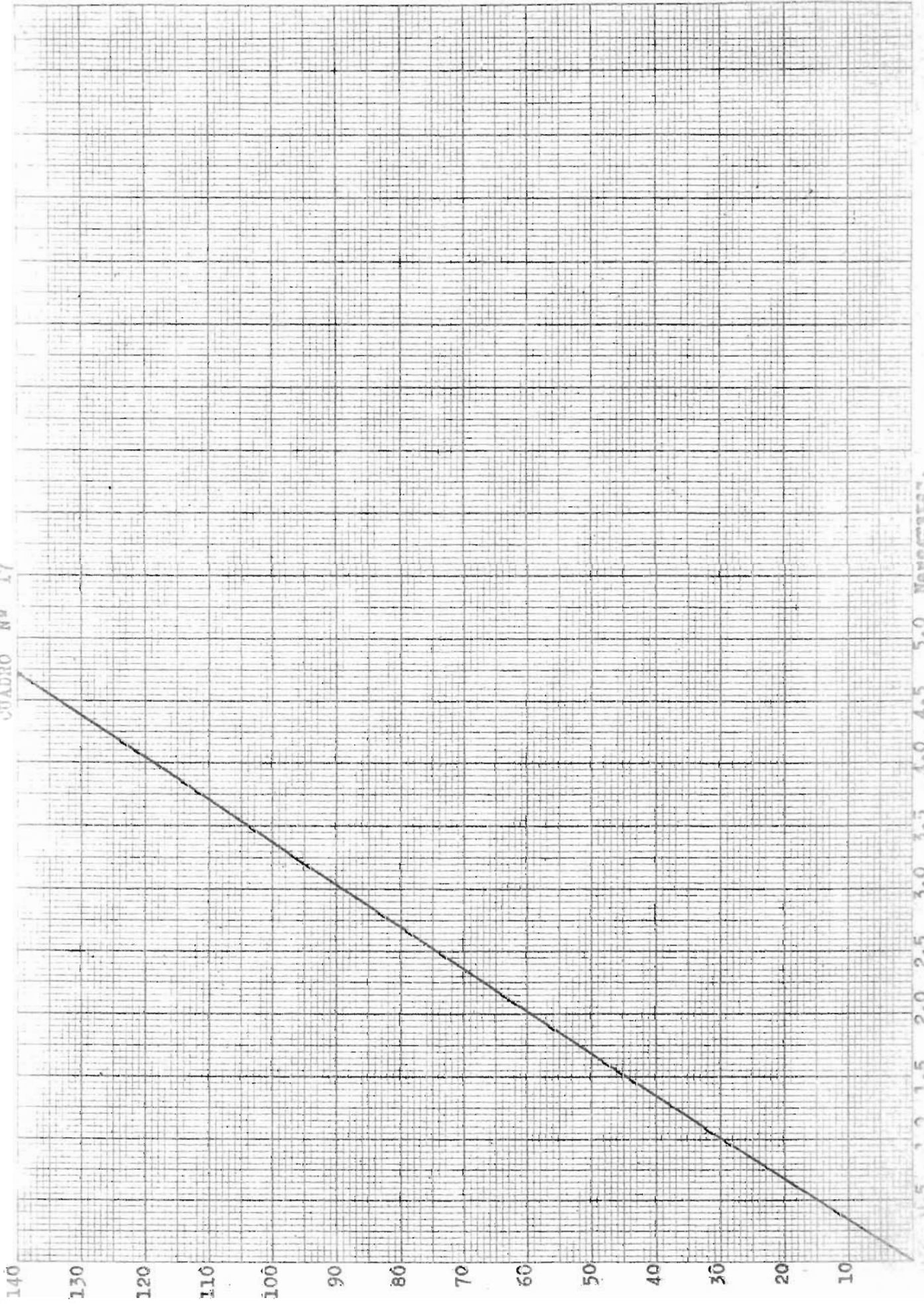
5 ml Gasas No 37-A Cantón San José La Palma



5 ml Gasas No 40 Cantón San José La Palma



CUADRO Nº 17



0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0

140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10

T A B L A No. 11

CONCENTRACION DE INSECTICIDA ( OMS - 33 ) AMBIENTAL, DIAS DESPUES  
DE LA APLICACION

FECHA	CONTROL	CANTON LAS ISLETAS		CANTON SAN JOSE LA PALMA	
		Casa No. 1	Casa No. 2	Casa No. 3	Casa No. 40
10/ dic. 1970	150 mm.	37.14 Ng/l	25.0 Ng/l	11.68	7.14
17/ dic. 1970	152 mm.	4.285 Ng/l	22.85 Ng/l	6.42	6.42
24/ dic. 1970	163 mm.	-	17.85 Ng/l	2.85	4.28
30/ dic. 1970	195 mm.	-	11.42 Ng/l	2.14	3.57
7/ dic. 1970	135 mm.	5.0 Ng/l	5.65 Ng/l	5.71	4.28
14/ dic. 1970	167 mm.	12.85 Ng/l	4.28 Ng/l	3.57	17.85
					11.42
					5.71
					5.0
					4.28
					5.71
					4.28 Ng.
					5.71 Ng.
					7.85
					5.0 Ng.
					2.1 Ng.
					2.14 Ng.
					4.28 Ng.
					5.71 Ng.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Método No. 1.

Con este método se sacó en claro, que los insectos al contacto de los insecticidas, tienen la facultad adaptarse haciéndose resistentes y para ello, su organismo elabora sustancias que antagonizan con el poder tóxico del insecticida y eso es el resultado por el descontrol con que son usados los mencionados compuestos en la agricultura, principalmente en las plantaciones de algodón, en las cuales se utilizan cantidades exageradas, sin tomar en cuenta los problemas que posteriormente pueden resultar, como en el presente caso, por ejemplo, que se ha aplicado bajo volumen ( ULV ) y se ha obtenido un fracaso parcial, dificultando, detener la rápida proliferación del zancudo y en consecuencia la transmisión de la Malaria y el Paludismo.

A raíz de eso, sería recomendable el control en la aplicación de los insecticidas agrícolas, trabajo que lo desarrollaría perfectamente un Entomólogo.

Método No. 2.

Habiendo comparado la cantidad de insecticida encontrada en cada una de las cepas, Resistentes y Susceptible, notando que la cantidad encontrada en la cepa Resistente fue mayor que la encontrada en la cepa Susceptible y es de hacer notar, que los zancudos de la cepa Resistente estaban vivos antes de la prueba y fue necesario sacrificarlos, con cloroformo para realizar el ensayo; -- mientras que los de la cepa susceptible ya estaban muertos, por lo que se determina la marcada resistencia que el zancudo ha criado por el DDT, principalmente en la zona que corresponde al Puerto de La Libertad y playas vecinas y eso se debe al variado número de plantaciones de algodón que hay por la región.

Método No. 3.

En este ensayo, se encontró una concentración de insecticida mucho mayor en partes del estero de Ticuiziapa, que en cualquier otro lugar de la zona tratada y -- ésto se debe, a que el estero no tiene salida al mar, salvo en ciertas épocas del año, siendo alimentado por la desembocadura del río San Antonio, a el cual también le ha-



sido aplicado insecticida y éste lo ha arrastrado hasta el estero, concentrando más el insecticida en él.

Otro factor de concentración en el estero fue que éste, no tiene cobertura en sus márgenes de ninguna vegetación, recibiendo buena cantidad de insecticida directamente.

En las partes en que la concentración resultó baja, se debió a la dilución, que irremediablemente sufre el insecticida con la gran cantidad de agua, pero -- con todo y eso, el porcentaje de larvas, en la pesquiza-larvoria, disminuyó notablemente, asociando también el resultado, a que los días de aplicación fueron varios y consecutivos.

En los demás ríos, como decir, el río el Tunco, el Jute, Aquiequillo, la persistencia del pesticida fue muy corta, a causa de que la corriente fue muy fuerte y ésta arrastró el compuesto hacia el mar, cosa que no pasó con el río Amayo, cuya corriente es casi nula en tiempo seco, y si su nivel de insecticida fue bajo, fue porque está cubierto de espeso follaje.

La brisa contribuyó también a esparcir el in-



secticida algunas veces, y en ocasiones que soplaban más fuerte, la nube de insecticida era llevada a las alturas, impidiendo que llegara a la superficie del suelo en donde se encontraban los depósitos de agua o criaderos de larvas, además de los refugios naturales de los adultos.

En consecuencia, este método sólo es aplicable sobre receptáculos de agua fijos y sobre la superficie del suelo, pero a muy baja altura para evitar, la pérdida por causa del viento o el depósito de la nube de insecticida en las alturas o copas de los árboles en donde no sirve para nada.

#### Método No. 4.

El OMS - 33, conocido también con el nombre de Baygón, Propoxur u Oxipropoxifenil Metil Carbamato, es fácilmente influenciado por el ambiente, es decir, su poder fumigante o volatilidad, aumenta a medida que aumenta la humedad y baja la temperatura, lo cual lo hace más tóxico, durante la noche y días húmedos.

Este fenómeno actúa sobre el insecto que combatimos, el cual ha disminuido mucho su frecuencia, ade-

más que algunos otros insectos de mayor tamaño.

El único inconveniente es que la acción tóxica del insecticida es de período muy corto y se aumenta la cantidad, por cada aplicación podría causar problemas a los animales de sangre caliente y por eso es que se toman todas las precauciones posibles ya que estas pruebas se verifican para encontrar el posible sustituto del DDT.

## R E S U M E N

I- En el presente trabajo se efectuaron, valiéndonos de técnicas Cromatográficas, ya sea en Capa Fina o Papel Cromatográfico y en fase gaseosa, las siguientes investigaciones:

1o. Determinación, por medio de Cromatografía en Capa fina y papel Cromatográfico, de la diferencia en su composición de larvas de zancudo del género Anopheles, que son resistentes a algunos insecticidas, principalmente al DDT, con otras larvas de la misma especie, pero que las cuales son susceptibles a los insecticidas.

2o. Estudio y determinación, por Cromatografía en Gases, de la resistencia o susceptibilidad a la Toxicidad de algunos insecticidas, principalmente DDT, de algunos zancudos adultos Anopheles, de la zona del Puerto de La Libertad y la capacidad de absorción del insecticida a través de sus patas, comprobando con eso, el poder residual del insecticida,

3o. Estudio del poder residual del insecticida

da Malathión, usado como larvicida, en diferentes lugares de una zona, la cual fue rociada por aire tomando como muestras, diferentes sustancias y objetos que estuvieron expuestos al rociado, por ejemplo: agua de esteros, agua de ríos, zacate de diferentes potreros, hojas de caña de azúcar, usando para dicho estudio, - Cromatografía de Gases.

4o. Ensayo y determinación del poder fumigante del insecticida OMS - 33 conocido también como Baygón en una zona fumigada con este compuesto, con el fin de obtener un sustituto del conocido DDT, el cual ya es inocuo a ciertas especies de insectos, --- principalmente los transmisores de la Malaria y Paludismo.

II- De dichas investigaciones se obtuvieron los siguientes Resultados:

1o. Que se encontró una sustancia mucho más frecuente o en mucha mayor cantidad, en las larvas de zancudo de la cepa resistente, que en la cepa de larvas de zancudos catalogados como susceptibles al DDT.

Esta sustancia no ha sido identificada aquí,

por estarse trabajando todavía en ella.

2o. Que la cantidad de insecticida encontrado en las patas de zancudos Anopheles, catalogados como Resistentes, fue mucho mayor que la cantidad encontrada en las patas de los zancudos identificados como cepa Susceptible.

Es de notar que los zancudos de la cepa Resistente, estaban vivos antes de la prueba, mientras que los de la cepa Susceptible ya estaban muertos.

3o. Después de aplicado, por aspersión aérea, el insecticida Malathión y tratar de determinar, su poder residual, se determinó, que según el sitio donde éste cayó, así fue el tiempo que duró, es decir, en las plantaciones de mayor altura, duró mucho más, que en las plantaciones de menor altura, por haber recibido más y no dejar que llegase hasta el suelo o a menor altura.

En las retenciones de agua, como esteros e incluso en casos de follaje, la cantidad de insecticida fue mayor, máxime si desemboca algún río sobre ellos, el cual lleva insecticida.

En los casos de los ríos cuya corriente es fuerte o medianamente fuerte, el insecticida tiene un período de duración extremadamente corto, por ser arrastrado por la misma, hasta el mar en donde el insecticida se pierde.

En donde la corriente del río es nula o casi nula, si no se encontró insecticida fue porque, la vegetación fue abundante y cubría el cauce, no pudiendo llegar el insecticida hasta la superficie del suelo

4o. Las pruebas del poder fumigante verificados para el insecticida OMS - 33 o Baygón, demostraron, que se encontró mayor cantidad en el medio ambiente, cuando el tiempo estaba húmedo y la temperatura ambiental estaba baja; pero que experimenta pequeña desventaja, pues el período de duración es extremadamente corto, relacionándolo con el período de duración que experimenta el DDT que dura mucho más.

### III- Conclusiones:

1o. Que los insectos, desde larvas, con el -

contacto de cantidades exageradas de insecticidas, llega un momento en que se adaptan a ellos, haciéndose se resistentes, elaborando sustancias que antagonizan con el poder tóxico del insecticida.

2o. Que los insectos, en este caso los zancudos transmisores del Paludismo y la Malaria, los Anopheles, se pueden dividir en dos grupos: a) los Resistentes, los cuales pueden estar en contacto con una superficie que contenga una capa residual de insecticida y que éste se adhiera a sus patas, sin que muera de inmediato; b) los Susceptibles, los cuales mueren inmediatamente después de haber estado en contacto con la mencionada superficie.

3o. Que cuando se quiere aprovechar el poder residual de un insecticida éste se debe aplicar directamente sobre la superficie que se quiere, aunque cueste tiempo y dinero, pues, de lo contrario, los resultados serán parcialmente positivos o negativos totalmente, como en el caso del insecticida que cayó sobre las alturas de una plantación, quedando las plantaciones de menor altura, con poco o sin ninguna aplicación, o en el caso que caiga sobre ríos en constante movimiento, en los cuales el insecticida



da se pierde, pues la corriente lo arrastra hasta el mar.

Los resultantes positivos se lograron en - corto tiempo, únicamente, en las superficies carentes de follaje o en donde el agua se encontraba retenida, y la nube de insecticida que logró atravesar el espe- so follaje, mató muchos zancudos adultos, que poste- riormente pudieron reproducirse.

4o. Que a pesar de que el período de reten- ción del OMS - 33 o Baygón es corto, aplicado en can- tidad adecuada y metodicamente en las viviendas, es- decir, según el tipo de vivienda, éste producto rin- de resultados positivos, sin poner en peligro la sa- lud de las personas y de los animales que ingieren - los productos de destrucción del insecticida, pudien- do llegar a ser el óptimo sustituto del casi insusti- tuible DDT.

Como se puede ver, en este trabajo, los re- sultados, algunas veces, quedan medianamente concluí- dos, pero todo cabe dentro de los límites del campo- investigativo.

## B I B L I O G R A F I A

- 1- BECKMAN, H. and GARBER, D., Journal of Ass of Analyt Chems  
vol. 52 (1969) p. 286-293.
- 2- BECKMAN, H. and GARBER, D., J. an of Anali: ~~Chemist~~ vol. 52  
(1959) 286-293.
- 3- DALE, W. E. and MILES, J. W., Agricultural and Food Chemis--  
try vol. 17 p. 60 (1969). American Chemical -  
Society.
- 4- FORATTINI, O. P., "Entomología Médica", vol. I (1962) p. ---  
625-632.
- 5- 4-JOAC, Changes in official Methods of Análisis 1967, 50 (2)  
p. 212-214.
- 6- KADOUM, A. M. and ENVIROM, Bull, Contam. Toxicol 3 (1968) p.  
354-359. Ed. Springer. Verlog New York Inc.
- 7- 10-MILES, J. W., FETZER, L. E. and PEARCE, G. W., Enviromen-  
tal Science and Technology, vol. 4 (1970) p. -  
420-425.

- 8- MURTHY, M. R. V. and MICKS J., D. W., Chromatography 8 (1962)  
p. 129-132.
- 9- 11-NAIR, P. P. and PINELLI, J., Chromatography 47(1970) p. -  
513-518.
- 10- SHAFIK, M. T., SULLVAN, H. C. and ENOS, H. F., Bull Envirom -  
Contam. and Toxicology, vol. 6 (1971) p. 34-  
39.
- 11- TEASLY, J. I. and COX, W. S., Det of Pesticidas in Water by -  
Microcoulumetric Gas Chromatography after Li  
qui Liquid Extraction. J. Amer. Water Words-  
Ass 55 (1) p. 1093-1096.
- 12- WILSON, A. J., Jr. Pesticide Analytical Manual for BCF Con---  
tracting Agencies. U. S. Burean of Commer---  
cial Fisheries, Biological Lab. Gulf Breese-  
Florida, p. 32561.