

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

TESIS
METODO ANALITICO PARA LA DETERMINACION DE AMITRAZ EN BAÑOS
POR CROMATOGRAFIA DE GASES.

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA
ROGELIO OLIVAREZ ROMERO

MEXICO, D.F.

2006



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	ISAURA LUISA CARRERA GARCIA
VOCAL	PATRICIA ELIZALDE GALVAN
SECRETARIO	FRANCISCO ROJO CALLEJAS
1er SUPLENTE	RICARDO RODRIGUEZ SAENZ
2do SUPLENTE	MARIA DE LOURDES CERVANTES AYALA

SITIO DONDE SE DESAROLLO EL TEMA
LABORATORIO 224 DEL DEPARTAMENTO DE QUIMICA ORGANICA DIVISION
DE ESTUDIOS DE POSGRADO FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.

ASESOR DE TESIS

Q. PATRICIA ELIZALDE GALVAN

SUPERVISOR TECNICO

M. en C. ELBA ROJAS ESCUDERO

SUSTENTANTE

ROGELIO OLIVAREZ ROMERO

**DEDICO ESTE TRABAJO DE TESIS A MI MADRE QUE TUVO
PRIMERAMENTE EL AMOR DE CUIDARME Y LA PACIENCIA DE SOPORTAR
TANTOS DESENFRENOS.**

A MI PADRE POR DARMER LA VIDA.

**A MIS HERMANOS ELIA, EVA, MARICELA, GABRIELA Y JOSE LUIS POR
DARME TODO SU CARIÑO Y CUIDADOS.**

**A MI ESPOSA JEANNTE POR IMPULSARME TODOS LOS DIAS PARA SER
MEJOR HOMBRE Y A MI HIJO AXEL POR DARMER TANTAS ALEGRIAS.**

AGRADECIMIENTOS

A dios por darme la oportunidad de terminar esta hermosa carrera

Con todo respeto a mis queridas profesoras Patricia Elizalde y Elba Rojas que fueron muy pacientes, tolerantes pero también exigentes con su servidor durante mucho tiempo.

Al profesor Francisco Rojo por el apoyo brindado para terminar mi tesis.

A la profesora Isaura por ser tan comprensiva y excelente profesora

A mis amigos Luis Antonio, Jahir, Verónica, Ana Luisa y Elena

	Pág.
INTRODUCCION	1
I ANTECEDENTES	4
I.1 Las garrapatas y su importancia veterinaria	4
I.2 Los plaguicidas	5
I.3 Cromatografía	9
I.3.1 Cromatografía de Gases	11
II PARTE EXPERIMENTAL	16
II.1 Reactivos, materiales y equipo	16
II.2 Método de extracción	17
II.3 Método de Cuantificación por Cromatografía de gases	18
II.4 Linealidad del sistema	20
II.5 Límite de detección y cuantificación	20
II.6 Linealidad del Método	20
II.7 Recobro	21
II.8 Determinación de Amitraz en Taktic® y Bovitraz® por Cromatografía por cromatografía de gases	21
II.9 Método para la determinación de Amitraz en presencia de lodo o estiércol en los productos comerciales Taktic® y Bovitraz®	23
III RESULTADOS	24
III.1 Método Analítico	24
III.1.1 Condiciones Cromatograficas	24
III.1.2 Linealidad del sistema	26
III.1.3 Límite de detección y cuantificación	29
III.1.4 Linealidad del Método	30
III.1.5 Cuantificación de amitraz en las muestras comerciales de Taktic® y Bovitraz®	33
III.1.6 Recobro	35
III.1.7 Análisis cuantitativo de Amitraz en los baños de Taktic y Bovitraz en presencia de lodo	36
III.1.8 Análisis cuantitativo de Amitraz en los baños de Taktic y Bovitraz en presencia de estiércol	38
IV ANALISIS DE RESULTADOS	41
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFIA	48
GLOSARIO	51
ABREVIATURAS	54

INTRODUCCION

La babesiosis bovina causada por *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, es la enfermedad protozoaria transmitida por garrapatas que tiene mayor importancia económica en la ganadería de las regiones tropicales. Al menos 1.3 billones de animales domésticos están potencialmente expuestos a uno o más especies de *Babesia sp.*, *B.bovis* y *B.bigemina*. Se presenta en áreas tropicales y subtropicales del mundo y su patrón de distribución está limitado a la presencia de su vector Boophilus (Garrapatas) (1).

Una manera de minimizar el impacto de la Babesiosis es diseñar programas para la erradicación o control de los vectores.

Taktic y Bovitraz son algunos de los productos comerciales utilizados para combatir las garrapatas y su principio activo es el Amitraz. El proceso para eliminar las garrapatas del ganado consiste en pasar cada animal por un baño preparado con alguno de los productos que existen en el mercado (2).

Para preparar el baño se utilizan 1.6 L de Taktic® o Bovitraz® concentrado emulsificable (C.E) por cada 1000 L de agua y 6 Kg de cal hidratada (2). El animal al pasar por el baño desaloja agua junto con amitraz y cal; después de cierto número de animales bañados la pérdida de estos analitos tiene que ser recuperada, añadiendo 3.2 L de Taktic o Bovitraz y 12 Kg de cal por cada 1000 L de agua faltante, a este proceso se le llama recarga (2).

El animal al pasar por el baño introduce contaminantes como son lodo, estiércol, pelo, etc., que ocasionan problemas en la efectividad del baño debido a diferentes formas de acción; uno de esos problemas puede ser que el principio activo quede ocluido en los sólidos y por lo tanto se impida su actividad. Los contaminantes relativamente grandes arrastran por gravedad al Amitraz y pueden disminuir el contacto íntimo del Amitraz con las garrapatas. Como los contaminantes se unen fácilmente al Amitraz por atracción de cargas eléctricas diferentes, se impide su adecuado funcionamiento en las garrapatas ya que se produce un cambio en su estructura e impide que éste actúe en los receptores nerviosos de la garrapata (2).

Aunque los baños se mantienen controlados en cuanto a la cantidad máxima de contaminantes que pueden contener (no mayor al 15 %) se ha presentado un problema en la efectividad del producto. Si no se atiende este problema y se sigue trabajando por debajo de la concentración efectiva del producto, las garrapatas pueden crear resistencia (3), lo que acarrearía grandes daños en la economía ganadera junto con los problemas que esto implica.

En el baño de los animales el principal contaminante es el lodo, seguido del estiércol, lo que hace suponer que alguno de los dos o ambos interfieren de manera significativa en la concentración de Amitraz en los baños.

La revisión de la literatura permitió establecer las condiciones de análisis adecuadas para la extracción de Amitraz [donde utilizan acetona como disolvente y hexano para realizar las extracciones (4,5)] y su posterior cuantificación por el método de estándar interno (EI) por Cromatografía de Gases Capilar (CGC). En este trabajo se optimizó el método de extracción y cuantificación de Amitraz con estándar y en dos productos comerciales. También se evaluó a nivel laboratorio la interferencia de lodo y estiércol en los baños para determinar cual es la causa de la baja o nula eficiencia del Amitraz después de un tiempo de utilizar estos baños.

El trabajo consta de capítulos. En el primero, antecedentes, se habla de aspectos generales sobre las garrapatas y su importancia para el hombre, del Amitraz como acaricida, aspectos generales de la Cromatografía y algunos métodos de análisis de Amitraz por Cromatografía de Gases, en el segundo capítulo, parte experimental, se describe la metodología, en el tercer capítulo, resultados, se muestran tablas y figuras que ayudan a la comprensión del experimento y en el cuarto capítulo se presenta el análisis de resultados. Finalmente las conclusiones, la bibliografía y el glosario de términos utilizados en el presente trabajo.

Objetivos

- Determinar Amitraz en concentrados emulsificables de diferentes productos comerciales en baños para ganado.
- Determinar si el Amitraz presente en algunos concentrados emulsificables de diferentes marcas comerciales es adsorbido en lodo o estiércol cuando se utilizan en baños para ganado.

Objetivos particulares

- Optimizar un método de extracción para Amitraz.
- Establecer las condiciones por Cromatografía de Gases para el análisis cuantitativo de Amitraz.
- Determinar el límite de detección, límite de cuantificación, linealidad del sistema, linealidad del método y porcentaje de recobro del método de análisis.
- Determinar Amitraz en los productos comerciales llamados Taktic® y Bovitraz®.
- Determinar Amitraz en baños de Taktic® y Bovitraz® en presencia de lodo o estiércol.

CAPITULO I

ANTECEDENTES

I.1 LAS GARRAPATAS Y SU IMPORTANCIA VETERINARIA

Las garrapatas y las enfermedades que transmiten son un problema de salud pública y veterinaria, causante de pérdidas millonarias en todo el mundo (6). El problema varía dependiendo de la región de la especie de garrapata presente del agente transmisible la situación socioeconómica y el avance tecnológico con que cuenta la región (1).

El efecto directo de las garrapatas sobre la producción ganadera, resulta del daño en las pieles por la picadura, pérdida de sangre y el efecto de las toxinas. En el caso de las vacas lecheras los abscesos dañan las glándulas mamarias y por consecuencia hay disminución en la producción de la leche. El efecto indirecto esta dado por las enfermedades que transmiten, como son: *Anaplasmosis* y *Babesiosis* (tristeza) (1,7). La infección produce un síndrome que puede tener un curso benigno con recuperación espontánea o progresar a una segunda fase y producir una condición debilitante con fiebre y anemia hemolítica que finaliza con la muerte (1).

En México se han identificado 77 especies de garrapatas, teniendo mayor importancia para el ganado bovino las siguientes especies: *B. microplus*, *B. annulatus* y *A. cajennense*, que producen perdidas directas anuales de más de 180 millones de dólares (7).

La especie de *B. microplus* presenta en nuestro país una distribución que abarca zonas tropicales, templadas y áridas cubriendo el 53% del territorio nacional. La

distribución de *B. annulatus* es muy diferente, presentándose en zonas áridas y templadas cubriendo el 27% del territorio nacional (1).

El ciclo de vida de la garrapata se divide en 2 fases: La parasitaria, sobre el bovino (dura aproximadamente 21 días) y la no parasitaria, sobre el suelo y los pastos (su duración depende del clima).

El ciclo comienza cuando una garrapata adulta repleta de huevos se desprende del animal y cae al suelo, donde luego de unos días deposita huevos y muere. Esos huevos, después de unos días, darán origen a pequeñas larvas; las más activas trepan a los pastos en espera del bovino a parasitar. Sobre el huésped comienza a alimentarse de sangre durante 21 días, tiempo que tarda el parásito en completar su ciclo en el animal (de larva a adulto) (7). Factores como la edad de la garrapata y las condiciones de temperatura y humedad afectan la transmisión e infestación (1,6). Los mayores índices de reproducción tienen lugar en primavera y otoño durante los meses de mayo y noviembre. Se dice que el número de animales enfermos es directamente proporcional al número de garrapatas producidas (1).

La mayoría de los bovinos son naturalmente resistentes a padecer Anaplasmosis y Babesiosis cuando la infección primaria se produce durante los primeros 7 meses de edad, lo cual confiere inmunidad de por vida. Pasado este periodo la resistencia natural decrece. La gravedad de la infección primaria está directamente relacionada con la edad del bovino (inmunidad materna) (8).

I.2 LOS PLAGUICIDAS

Debemos entender por plaguicida a una sustancia (o mezcla) destinada al control (muerte) de plagas, incluidos los vectores de enfermedades humanas y animales, así

como especies no deseadas que causen perjuicio o interferencia con la producción agropecuaria y forestal (5).

a) Se clasifican de acuerdo a :

- **ORGANISMOS QUE CONTROLAN.-** Acaricidas, Avicidas, Bactericidas, Fungicidas, Herbicidas, Insecticidas, Molusquicidas, Nematicidas, Ovicidas, Rodenticidas.
- **COMPOSICION QUIMICA.-** Formamidina, Organoclorados, Organofosforados, Carbonatados, Piretroides, Ftalimidas, Compuestos organometálicos con cobre y mercurio.
- **TOXICIDAD.-** Extrema (rojo), Alta (amarillo), Moderada (azul) y Ligera (verde).
- **MODOS DE ACCION.-** Absorción dérmica, Inhalación, Ingestión.
- **USOS AL QUE SE DESTINAN.-** Veterinario, Salud humana, Preservación, Agrícola.
- **PRESENTACIÓN.-** Gránulos, Polvos, Cebos, Sólidos, Líquidos, gaseosos (5).

Los productos comerciales conocidos como Taktic® y Bovitraz® son plaguicidas cuya clasificación es: acariciada de composición química conocida (Formamidina) de ligera toxicidad cuyo modo de acción es absorción dérmica de uso veterinario y su presentación es en polvo o líquido.

El uso de los garrapaticidas es frecuente en el establecimiento de baños por inmersión o por aspersion al ganado. La inmersión permite obtener una mejor cobertura del ganado con el acaricida. Un medio que se viene utilizando cada vez con mayor frecuencia es el uso de bolos de liberación lenta de acaricidas y de aretes impregnados del principio activo.

El desarrollo de la resistencia al acaricida es el principal inconveniente de su uso continuo. Las garrapatas de un solo huésped desarrollan resistencia más rápidamente, pasando de generación a generación (6).

Los acaricidas más utilizados son (9):

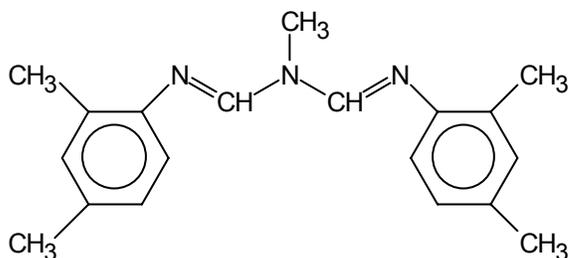
INGREDIENTES ACTIVOS	NOMBRE COMERCIAL	DOSIS (mL/L agua)	CONTROLA
Abamectina (1.8%)	Agrimec	0.8-1.25	Ácaros (<i>Tetranychus sp</i>)
Ometoato (70%)	Folimat	1-1.5	Chupadores (<i>Tetracyclus bemis</i>)
Fenpropatrin(38.5%))	Herald 37	0.8-1.25	Ácaros (<i>Tetranychus sp</i>)
Bifentrina (12%)	Talstar 100	0.8-1.5	Pulgones (<i>Tetranychus sp</i>)
Amitraz (12.5%)	Bovitraz® Tactic®	1-2	Garrapatas, (<i>B.microplus</i> <i>B.annulatus, B.cajeanense</i>)

b) AMITRAZ, UN ACARICIDA.

El Amitraz es un plaguicida del tipo formamidina, introducido al mercado por “The Boots Company Limited” (ahora Schering AG) distribuida por la compañía farmacéutica Wellcome para el control de formas móviles de ácaros en cosechas de frutas maduras y cítricos, así como garrapatas de animales domésticos y ganado. Es también efectivo contra huevos y larvas de algunos lepidoptera y contra insectos como chinches, pulgones y chupadores entre otros (10).

Es comercializado con los nombres de Tactic® y Bovitraz® con presentaciones en polvos y concentrados emulsificables al 12.5% (p/v), preparados en recipientes como una suspensión acuosa para dar una concentración final de 0.025% de amitraz (p/v). La suspensión se estabiliza a pH 12 por la adición de 1% de cal hidratada comercial (contiene 80% de Ca(OH)₂). Otros sinónimos de amitraz son: Triazid y Azaform, cuyos nombres comerciales son: BAAM, ECTODEX, MITAC, TRIATOX. El código de designación es U-36,059. BTS-27,419,JA-119 y ENT-27,967 con un número de registro CAS : 33089-61-1 (10).

ESTRUCTURA QUIMICA



PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS (10)

- APARIENCIA: Polvo cristalino de color blanco o amarillo
- FORMULA MOLECULAR: $C_{19}H_{23}N_3$
- PESO MOLECULAR: 293.4 g/mol
- PUNTO DE FUSIÓN: 86-87 °C
- ACIDEZ Y ALCALINIDAD: Base débil
- SOLUBILIDAD: En disolventes orgánicos
- PRESION DE VAPOR (20°C): 3.8×10^{-7} mmHg

El Amitraz es hidrolizado rápidamente a valores bajos de pH formando un ácido estable, 2,4-dimetilformamidina que puede ser a su vez hidrolizado a 2,4-dimetilanilina (11,12).

I.3 CROMATOGRAFÍA

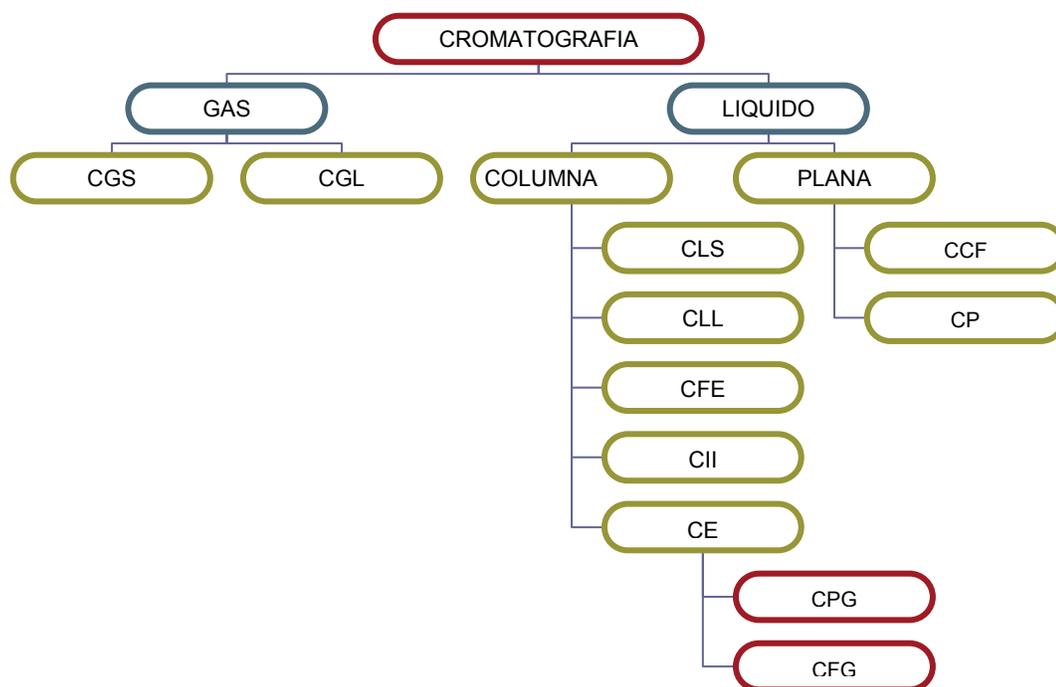
La Cromatografía es una técnica donde los componentes, son separados, por distribución entre 2 fases una de las cuales es la estacionaria y la otra un fluido que pasa a través de la fase estacionaria (13). Esta técnica permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla (14).

La Cromatografía tuvo sus inicios en 1850 con la separación de anilinas por F.F.Runge, utilizando un filtro de papel y un disolvente. En 1906 Tswett presentó la primera separación de unos pigmentos vegetales; a esta técnica se le llamó Cromatografía, estudio de los colores. En 1941 Martín y Singe propusieron el uso de un gas como fase móvil, pero fué hasta 1952 cuando Martín y James describieron el primer cromatógrafo de gases, el cual poseía un detector sensible a bases y ácidos.

Posteriormente Ray publicó la creación del detector de conductividad térmica, y no tardó en aplicarse a compuestos orgánicos e inorgánicos. En 1954 apareció el primer equipo a la venta (13).

De acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas y a los mecanismos de separación, la cromatografía se divide en Cromatografía de gases y Cromatografía de líquidos.

1.3.1 CLASIFICACION



CGS Cromatografía gas-sólido, CGL Cromatografía gas-liquido, CLS Cromatografía liquido-sólido, CLL Cromatografía liquido-liquido, CFE Cromatografía de fase enlazada, CII Cromatografía de intercambio iónico, CE Cromatografía de exclusión, CPG Cromatografía de permeación en gel, CFG Cromatografía de filtración en gel, CCF Cromatografía en capa fina, CP Cromatografía en papel.

I.3.1 CROMATOGRAFIA DE GASES

En la cromatografía de gases la fase móvil es un gas.

- Cuando la fase estacionaria es un sólido se dice que es cromatografía **gas-sólido**. El proceso de separación se lleva a cabo por adsorción entre el gas que transporta el soluto y la fase estacionaria que puede ser silicones y polímeros.
- Y cuando es un líquido, se dice que es cromatografía **gas-líquido**. El proceso de separación se lleva a cabo por partición entre la fase estacionaria líquida que recubre a un soporte sólido inerte, como cuentas de vidrio o tierra de diatomeas y el gas que transporta el soluto (14).

Cuando se introduce una sustancia en la corriente del gas, ésta se volatiliza por la temperatura elevada que se aplica al sistema y se distribuye en la columna entre la fase estacionaria y el gas acarreador. Este proceso de adsorción o partición entre ambas fases se cuantifica con el “factor de capacidad” k' y está determinado por la cantidad o por el tiempo de residencia de la sustancia en la fase estacionaria (14).

La Cromatografía no se puede usar para identificar compuestos sin compararlos con un estándar, debido a que es una técnica de separación. Para el análisis cualitativo, debe determinarse el tiempo de retención o el volumen de retención del soluto de una sustancia conocida (14).

Cuando un compuesto eluye en el mismo tiempo o en el mismo volumen de retención en las mismas condiciones experimentales, la probabilidad de una identificación correcta es muy alta (14).

El tiempo o el volumen de retención muertos, son factores importantes, utilizados para obtener los valores de retención absolutos y relativos para la caracterización de los compuestos y se calcula por la siguiente ecuación (14):

$$\text{Factor de capacidad} = K' = \frac{t_1 - t_0}{t_0} \dots \dots \dots \text{ecuación} \quad (1)$$

$$\text{Selectividad} = \alpha = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0} = \frac{K'_2}{K'_1} \dots \dots \dots \text{ecuación} \quad (2)$$

Donde:

t_2 : Tiempo de retención del soluto de mayor retención

t_1 : Tiempo de retención del soluto de menor retención

t_0 : Tiempo muerto (tiempo de retención para un componente que no se retiene en la fase estacionaria)

α : Selectividad ≥ 1

Cuando se utiliza el detector de ionización de flama, el cual no responde ni al aire ni al agua, la elusión de un compuesto que no se retenga en la columna tal como el metano o butano puede utilizarse para estimar el t_0 .

Para medir la eficiencia de la columna se calcula el número de platos teóricos (N) con las siguientes ecuaciones:

$$\text{Platos teóricos} = N = 16 \left(\frac{tr}{Wb} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{tr}{W_{0.5}} \right)^2 \dots \dots \dots \text{ecuación} \quad (3)$$

donde:

t_r : Tiempo de retención de la sustancia

W_b : Ancho de la base del pico

$W_{0.5}$: Ancho de la mitad de la altura del pico

La resolución es la medida cuantitativa del grado de separación de 2 picos y se calcula mediante la siguiente ecuación (13):

$$Resolucion = R = 2\left(\frac{t_2 - t_1}{W_{b1} + W_{b2}}\right) \dots \dots \dots \text{ecuacuación} \quad (4)$$

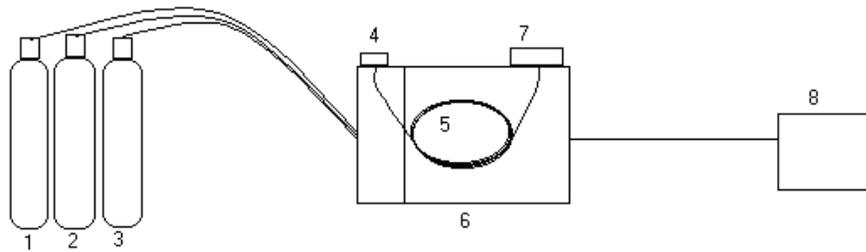
donde:

t_1 y t_2 : Tiempos de retención de los solutos 1 y 2

w_1 y w_2 : Es la amplitud de los picos a la línea base

La literatura reporta métodos Cromatográficos para identificar y cuantificar Amitraz, algunos son por Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) pero en la actualidad la mayoría de éstos utilizan la Cromatografía de gases (CG).

El proceso consiste en inyectar la muestra en el cromatógrafo. La elevada temperatura del inyector la volatiliza y el gas acarreador la arrastra hacia la columna se separan los componentes de la muestra, que posteriormente son detectados y registrados.



Esquema de un cromatógrafo de gases: (1) Hidrogeno (2) Aire (3) Nitrogeno (4) Inyector (5) Fase estacionaria (6) Horno (7) Detector y (8) Sistema de registro.

En Cromatografía de gases, los métodos para determinar cualquier analito combinan columnas y detectores; la mejor combinación columna-detector es aquella que satisfaga las necesidades del analista o la finalidad del método (16).

El primer método de análisis disponible para la determinación de Amitraz en baños de Tactic fue un método Cromatográfico Gas-Líquido (CGL) proporcionado por el fabricante “The Boots”. La principal desventaja de este método es el tiempo consumido en los pasos de análisis, por lo que se desarrollaron métodos alternativos para este análisis.

La determinación de Amitraz por Cromatografía de gases utilizando un detector de emisión atómica (DEA) provee una alta detección específica del elemento. La principal desventaja del DEA es su baja sensibilidad con respecto a otros métodos de detección selectivos usados en el análisis de residuos de pesticidas como son captura de electrones y detección nitrógeno-fósforo, específicamente en el análisis de trazas de nitrógeno. En la determinación de Amitraz a concentraciones bajas, se realizan inyecciones de volúmenes grandes o se utiliza una cantidad mayor de extracto de muestra. (17)

Al cuantificar Amitraz en baños de Taktic por HPLC se presenta el inconveniente de que la gran cantidad de cal hidratada utilizada en la preparación del baño (6Kg/1000L) interfiere con el análisis (15).

Michael V. Machin y Kerrin W. McDougal (4) realizaron la determinación de Amitraz en baños para gatos que consistía en utilizar Taktic® a una concentración final de 0.025% p/v; la suspensión fue estabilizada con hidróxido de calcio a pH12. Las muestras se analizaron en un Cromatógrafo de Gases equipado con un detector de ionización de flama, columna de vidrio de 6 pies por 3/16 pulgadas de diámetro interno, empacada con 2.5% DC-200 mas 3.75% QF-1 sobre Chromosorb de malla 80-100. La temperatura de la columna 245 °C, la temperatura del inyector y la temperatura del detector 250 °C. El flujo del gas acarreador Nitrógeno a 65 mL/min. Este método es preferido por ser simple, rápido y libre de interferencias, además determina la cantidad total de Amitraz presente en las muestras de los baños (4).

Otros métodos utilizados en la determinación de Amitraz en formulaciones de concentrados emulsificables (CE) al 12.5 % p/v por Cromatografía de gases utilizan columnas de vidrio empacadas, equipado con detector de ionización de flama, cambian la acetona que se utiliza como disolvente, por acetato de metilo. (18)

Otro método analítico para la cuantificación de Amitraz en baños para ovejas estabilizado con cal, utiliza un Cromatógrafo de gases equipado con un detector termoiónico, una columna de 1 m x 0.2 mm de diámetro interno, de fase estacionaria Ultrabond 20 M (5).

El método que se utiliza en el presente trabajo es una combinación de los métodos antes mencionados, el cual utiliza acetona para favorecer la extracción con hexano ya que el amitraz es muy soluble en este disolvente y posteriormente se analiza por Cromatografía de Gases utilizando un detector de ionización de flama y una columna DB-1 (Dimetilpolisiloxano).

CAPITULO II

PARTE EXPERIMENTAL

En este capítulo se describe el desarrollo del método cromatográfico para la determinación de Amitraz en baños preparados con dos de los productos comerciales Taktic® y Bovitraz® en su presentación de concentrados emulsificables (CE) y su aplicación para determinar si hay absorción o no en lodo y/o estiércol.

II.1 Reactivos, materiales y equipo.

II.1.1 Reactivos.

- Estándar de Amitraz lote-ACJB132-25
- Estándar de Escualano lote-BOA
- Taktic C.E al 12.5% p/v lote-YKOA030
- Bovitraz C.E al 12.5% p/v lote-0632432A2
- Hidróxido de calcio grado reactivo
- Agua grado HPLC
- Hexano grado HPLC
- Acetona grado HPLC
- Tierra de jardín y estiércol de vaca

II.1.2 Material.

- Matraces aforados
- Pipetas volumétricas
- Pipetas graduadas
- Pipetas Pasteur con bulbo
- Embudos de separación
- Embudo de filtración rápida
- Matraces erlenmeyer

Vasos de precipitados

Espátula

II.1.3 Equipo.

Cromatógrafo de Gases marca Varian, modelo 3300 equipado con inyector con divisor de flujo "Split" y Detector de ionización de flama (DIF); Columna DB-1 (dimetilpolisiloxano) J & W CAT. No 122-7032 de 30 metros de longitud por 0.25 milímetros de diámetro interno y 0.25 micrometros de espesor de película, conectado a un integrador marca Hewlett-Packard (HP) modelo 3390A. Las condiciones de la Rampa de calentamiento se muestran en la Tabla 1.

II.2 Método de extracción

II.2.1 Amitraz en baño de Tactic®

Se prepara un baño de Tactic® de la siguiente manera:

En un matraz aforado de 100 mL., colocar 0.16 mL de Tactic® y 0.6g de hidróxido de calcio, disolver y aforar con agua destilada (baño de Tactic®). Para efectuar la extracción de Amitraz se toma un volumen de 10 mL y se deposita en un embudo de separación, se agregan 5 mL de acetona. La extracción del Amitraz se realiza con cuatro porciones de 5 mL de hexano cada una, agitando dos minutos en cada extracción. Los extractos orgánicos se depositan en un matraz aforado de 25 mL al que se le adicionan 2 mL de estándar interno (Escualano a una concentración de 1.6 mg/mL) y se afora con hexano. De esta disolución se inyecta 1µL al Cromatógrafo de gases en las condiciones cromatográficas indicadas en la tabla 1. Este procedimiento se muestra en el diagrama 1.

II.2.2 Amitraz en baño de Bovitraz®

El procedimiento para determinar el analito en Bovitraz® es el mismo que se indica para Tactic®.

II.3 Método de cuantificación por Cromatografía de gases

Se utilizó el método de estándar interno, utilizando para este fin Escualano, las condiciones cromatográficas se presentan en la Tabla 1

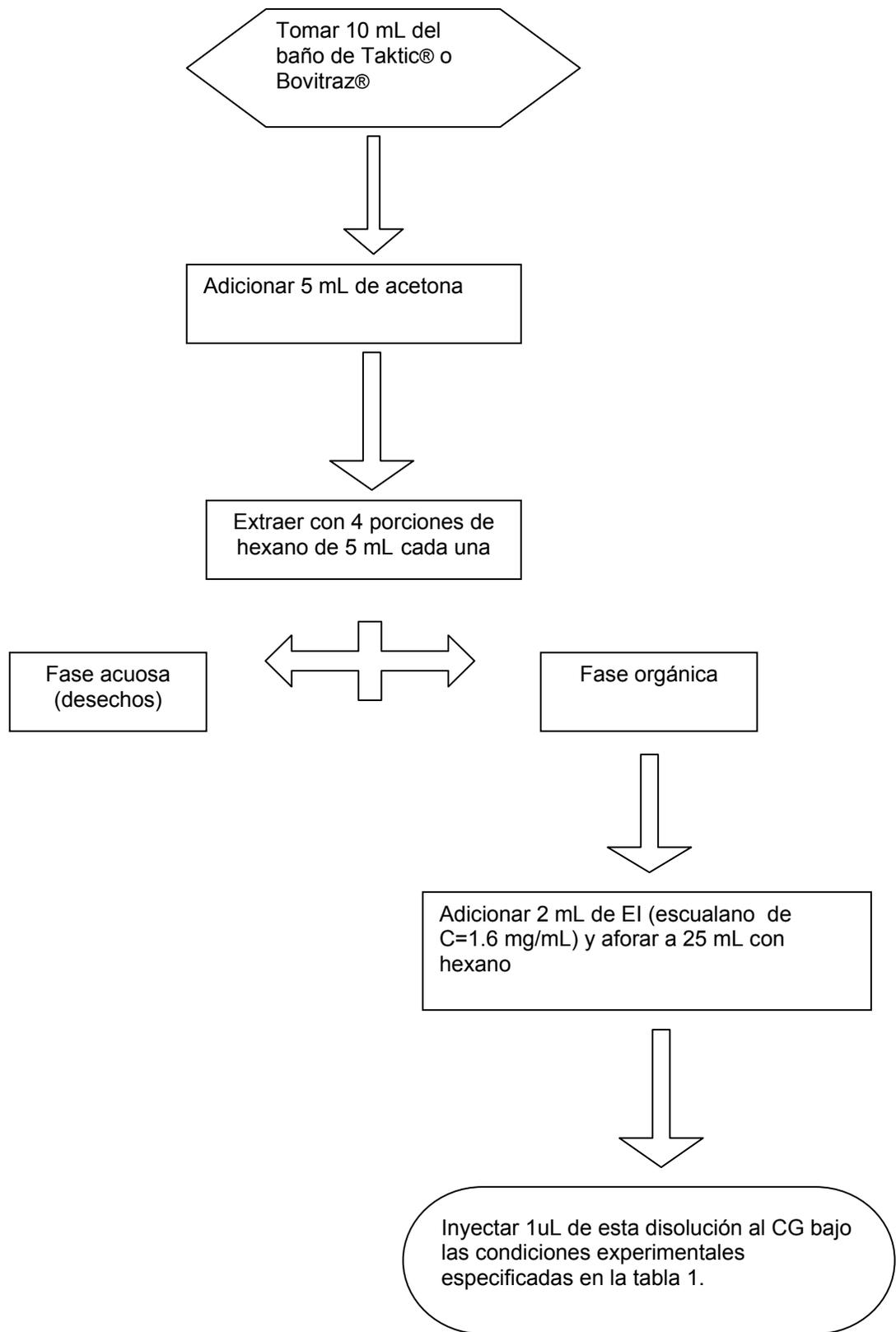


Diagrama 1. Procedimiento general para cuantificar Amitraz en baños preparados con Taktic® o Bovitraz®.

II.4 Linealidad del sistema.

Se evalúa la linealidad del sistema realizando tres curvas patrón de estándar de Amitraz en hexano en un intervalo de concentraciones de 10, 20, 40, 60, 80, 100 y 120 ppm

Procedimiento:

- a) Se prepara una disolución estándar de Amitraz (0.2 mg/mL) en hexano
- b) Se prepara una disolución de estándar de Escualano (0.8 mg/mL) en hexano
- c) De la disolución de estándar de Amitraz (0.2 mg/mL) tomar alícuotas de 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 mL depositarlas en matraces de 10mL. A cada matraz se le adiciona 1mL de estándar de Escualano (0.8 mg/mL) ajustar el aforo con hexano y agitar.
- d) Analizar por CG bajo las condiciones especificadas en la tabla 1

II.5 Limite de detección y cuantificación

Para determinar el límite de detección y de cuantificación se utilizan los resultados de la linealidad del sistema y estadísticamente se calcula su valor.

II.6 Linealidad del Método

Se evaluó la linealidad del método realizando tres curvas patrón de Amitraz en baños de Taktic® en un intervalo de concentraciones de: 0, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 ppm.

Procedimiento

- a) Preparar el Baño de Taktic®, para lo cual agregar 0.16 mL de Taktic C.E. + 0.6g de Ca (OH)₂ en un matraz aforado de 100 mL. Disolver y aforar con agua.

- b) Preparar una disolución estándar de Amitraz de concentración 0.5 mg/mL en acetona.
- c) Preparar una disolución de estándar interno (Escualano) de concentración 1.6 mg/mL en hexano.
- d) En 7 embudos de separación agregar 10 mL del baño de Taktic®.
- e) Adicionar a cada embudo 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 mL respectivamente de disolución de estándar de Amitraz (0.5 mg/mL) y ajustar a 5mL con acetona.
- f) Se les realiza a cada uno 4 extracciones con 5 mL de hexano.
- g) Se colectan los extractos orgánicos en Matraces Erlenmeyer de 25 mL, se secan con Na₂SO₄ y posteriormente se transfieren las disoluciones a matraces aforados de 25 mL.
- h) A cada matraz se le adicionan 2 mL de estándar interno y se ajusta el aforo con hexano.
- i) Cuantificar por CG bajo las condiciones especificadas en la tabla 1.

II.7 Recobro

El recobro se determinó realizando tres curvas patrón de Amitraz en baños de Taktic® en un intervalo de concentraciones de 0, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 ppm de la misma manera que en el inciso II.6.

II.8 Determinación de Amitraz en Taktic® y Bovitraz® por Cromatografía de Gases

Para la cuantificación de Amitraz en los productos comerciales Taktic® y Bovitraz® en su presentación de concentrados emulsificables (CE) se realizó el siguiente procedimiento que se esquematiza en el diagrama 2.

- a) Depositar 0.5 ml de Taktic® o Bovitraz® CE en un matraz de 10 mL. Disolver con 2 mL de acetona y aforar con hexano.
- b) De la disolución anterior tomar 0.5 mL y depositarlos en un matraz de 10 mL. Aforar con hexano.

- c) De la disolución anterior tomar 2 mL y depositarlos en un matraz de 10 mL agregar 1 mL de estándar interno (0.8 mg/mL) y aforar con hexano.
- d) Analizar por CG bajo las condiciones especificadas en la tabla 1.

Se prepara la curva patrón de Amitraz en un intervalo de concentraciones de 10, 20, 40, 60, 80, 100 y 120 ppm. Por interpolación en esta curva patrón se determina la concentración de Amitraz en las muestras comerciales. Las condiciones del análisis cromatográfico son las indicadas en la tabla 1.

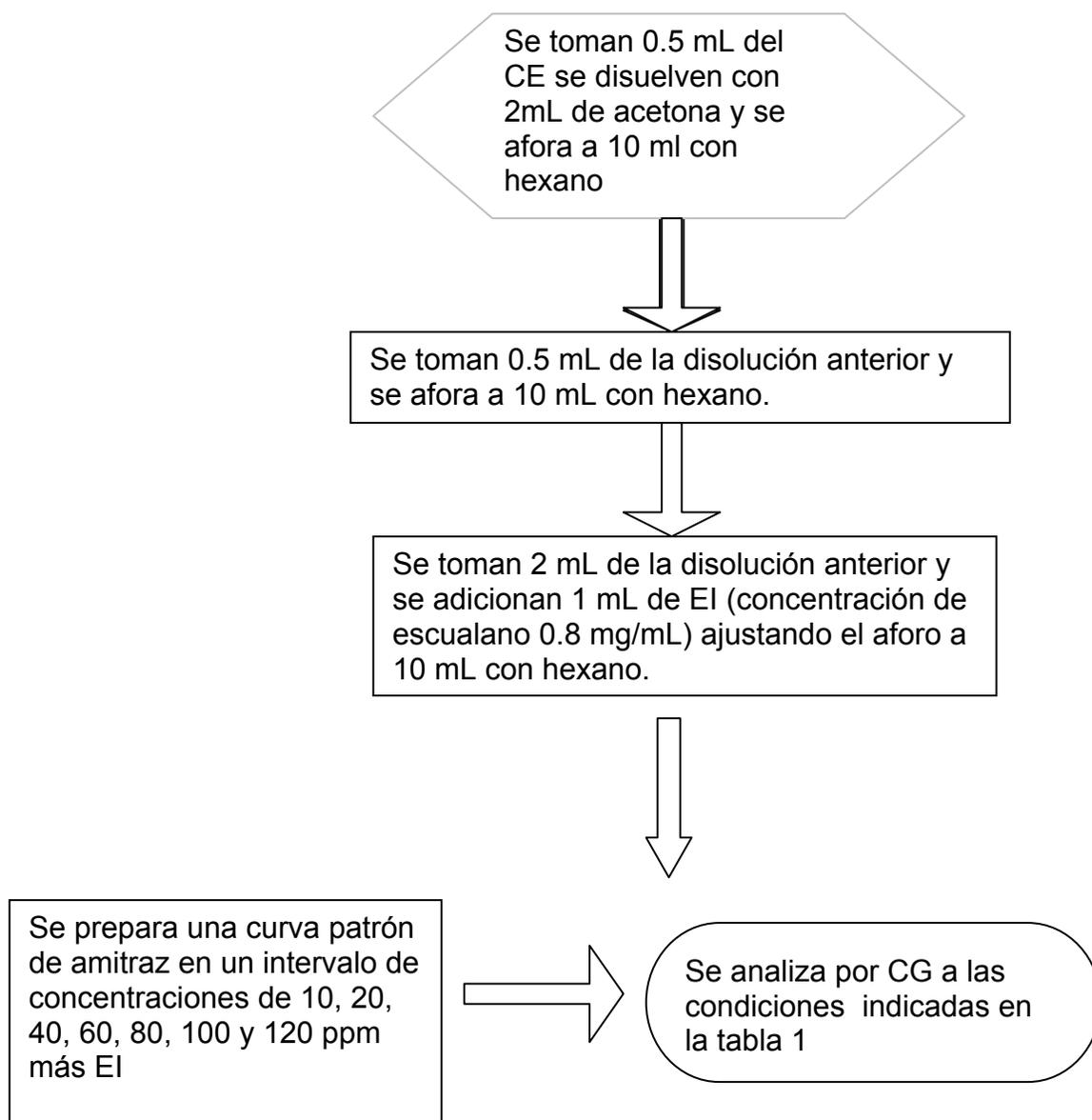


Diagrama 2. Esquema del análisis cuantitativo en los productos comerciales Taktic® y Bovitraz® en CE.

II.9 Método para la determinación de Amitraz en presencia de lodo o estiércol en los productos comerciales Tactic® y Bovitraz®

En el análisis cuantitativo de Amitraz en baños preparados con los productos comerciales Tactic® y Bovitraz® se adiciona lodo o estiércol con la finalidad de determinar si existe o no adsorción por alguna de estas dos interferencias que se encuentran presentes en los baños para ganado.

Se realiza el mismo procedimiento de extracción del inciso II.2, solo que después de agregar los 10 mL del baño de Tactic® o Bovitraz® se añade 1 g tierra ó 0.5 g de estiércol. Posteriormente se continúa el procedimiento descrito en el diagrama 1.

CAPITULO III

RESULTADOS

III.1 Método Analítico.

En este capítulo se presentan las condiciones cromatográficas, el límite de detección y cuantificación, la linealidad del sistema, la linealidad del método, el recobro así como también el porcentaje de recuperación de Amitraz presente en los Baños de Tactic® y Bovitraz® con lodo o con estiércol.

III.1.1 Condiciones Cromatográficas.

Las condiciones óptimas para una columna de 30 m por 0.25 mm de diámetro interno son la velocidad lineal en un intervalo de 25-30 cm/seg y el flujo de la columna entre 1.26-1.8 mL/min para Hidrógeno como fase móvil y una presión de 10 lb/in².

Con la información anterior se procedió a establecer las condiciones cromatográficas óptimas, para lo cual se inyectó al cromatógrafo una disolución estándar de Amitraz y estándar de Escualano (EI). En **la figura 1** se muestra un cromatograma en una de las etapas iniciales de la búsqueda de las condiciones adecuadas para la cuantificación de Amitraz por estándar interno. Se observa que el tiempo de retención del Amitraz es de 6.79 minutos y del Escualano de 7.68 minutos.

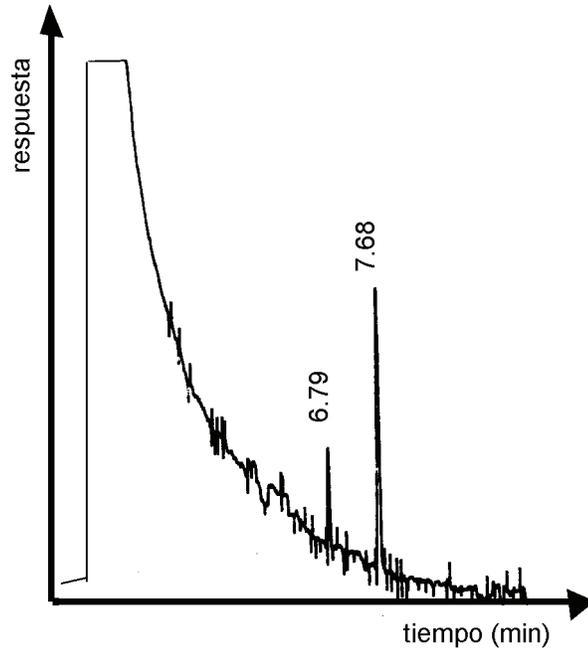


Figura 1. Cromatograma de estándar de Amitraz y Escualano como estándar interno.

La figura 2 muestra el cromatograma que se obtuvo con las condiciones finales de separación con un tiempo de retención para el Amitraz de 6.03 minutos y 6.86 minutos para el estándar interno. Las condiciones del análisis cromatográfico se presentan en la tabla 1.

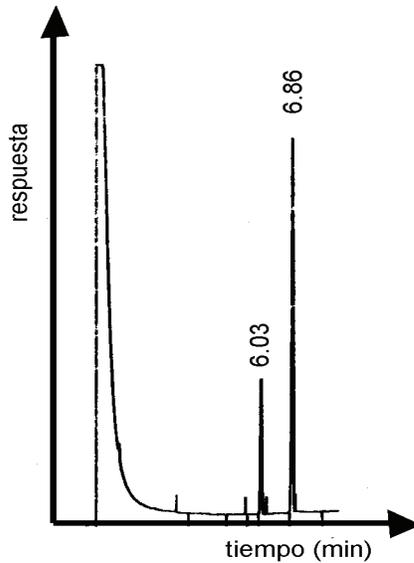


Figura 2. Cromatograma de estándar de Amitraz y Escualano como estándar interno, en las condiciones óptimas de separación.

Temperatura del inyector	300 ° C
Temperatura del detector	300 ° C
Programa de temperatura de la columna	
Temperatura inicial	250 ° C
Tiempo inicial	1min
Temperatura final	280 ° C
Tiempo final	1min
Velocidad de calentamiento	5 ° C/min
Flujo de Hidrógeno	30 mL/min
Flujo de Nitrógeno	30 mL/min
Flujo de Aire	300 mL/min
Relación de divisor de flujo ("split")	1:39
Velocidad lineal	31 cm/seg

Tabla 1. Condiciones cromatográficas de la rampa de calentamiento.

III.1.2 Linealidad del sistema (por el método de estándar interno EI)

El intervalo de concentración para determinar la linealidad del sistema se seleccionó en base a la concentración de Amitraz presente en los baños de Taktic® o Bovitraz® y de las diluciones a realizar para su determinación.

Para conocer la linealidad del sistema en el intervalo de concentración de 10 a 120 ppm, se realizaron tres curvas patrón de estándar de Amitraz en hexano, las cuales fueron analizadas para obtener el coeficiente de determinación (r^2). Mediante el análisis de mínimos cuadrados y utilizando la relación de áreas se obtuvo la ecuación de una recta con pendiente (m) y ordenada al origen (b) de cada una de las curvas patrón. En la tabla 2 se muestran los resultados de las tres curvas patrón.

Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
[EA]/[EI]	RA	[EA]/[EI]	RA	[EA]/[EI]	RA
0.09843	0.0929	0.10593	0.0275	0.11628	0.0352
0.19681	0.1369	0.21186	0.0572	0.23256	0.0703
0.39370	0.2793	0.42373	0.1235	0.46512	0.1527
0.59055	0.4237	0.63559	0.1972	0.69767	0.2560
0.78740	0.5630	0.84746	0.2874	0.93023	0.3298
0.98425	0.7426	1.05932	0.3702	1.16279	0.4044
1.18110	0.8851	1.27119	0.4520	1.39535	0.5083
Y = 0.7445X-0.0039		Y = 0.3686X-0.0234		Y = 0.3678X-0.0118	
$r^2 = 0.9986$		$r^2 = 0.9984$		$r^2 = 0.9990$	

[EA] concentración del estándar de Amitraz

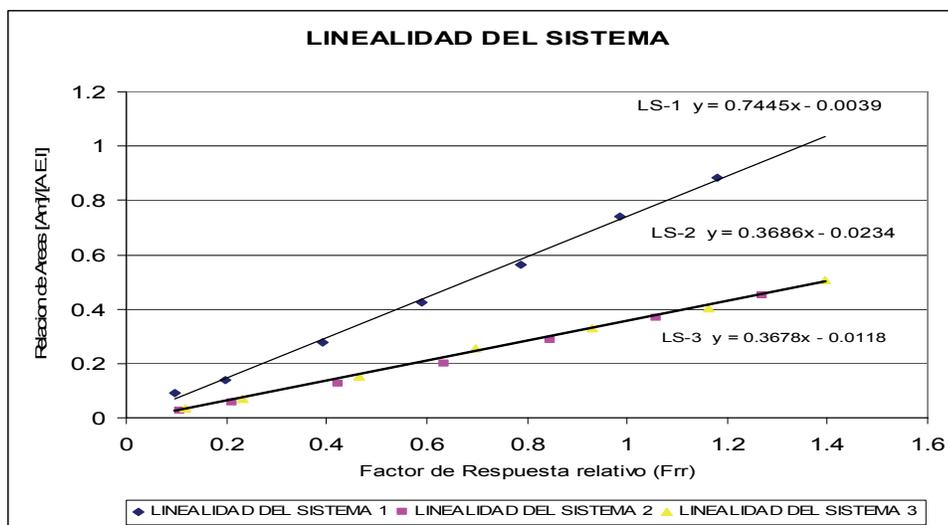
RA relación de Áreas (área EA/área EI)

r^2 coeficiente de determinación

[EI] concentración del estándar interno

Tabla 2. Resultados de la linealidad del sistema.

En la gráfica 1 se representan estos resultados



Gráfica 1. Linealidad del Sistema (Curvas patrón).

En **la figura 3** se muestra un cromatograma a una concentración de Amitraz de 40 ppm y en **la figura 4** a una concentración de 100 ppm.

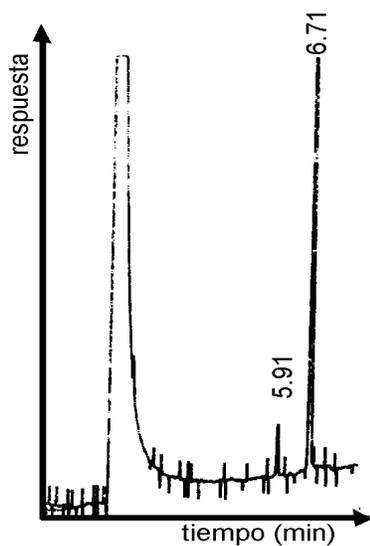


Figura 3. Cromatograma de estándar de amitraz ($t_r=5.91$ min) a una concentración de 40 ppm con estándar interno de escualano ($t_r=6.71$ min) a una concentración de 88.8 ppm.

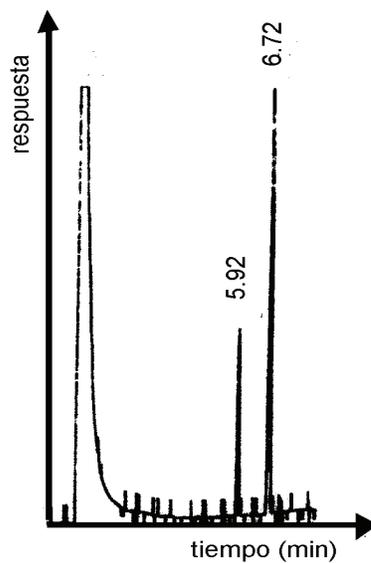


Figura 4. Cromatograma de estándar de amitraz ($t_r=5.92$ min) a una concentración de 100 ppm con estándar interno de escualano ($t_r=6.72$ min) a una concentración de 88.8 ppm.

III.1.3 Limite de detección y cuantificación

En **la figura 5** se presenta el cromatograma de amitraz a una concentración de 5 ppm. En éste se aprecia como el ruido se puede confundir con la respuesta del analito.

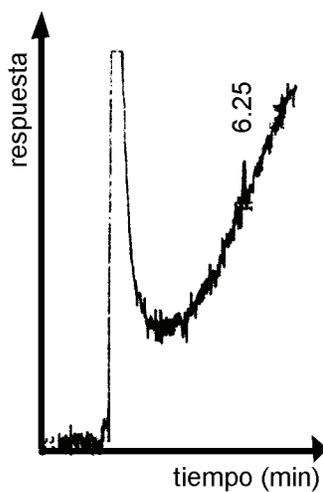


Figura 5 Cromatograma de estándar de amitraz ($t_r=6.25$ min) a una concentración de 5ppm.

En **la figura 6** se muestra el cromatograma de Amitraz a una concentración de 10 ppm. En este caso la respuesta es más clara.

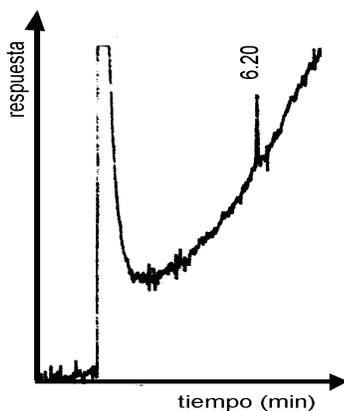


Figura 6 Cromatograma de estándar de amitraz ($t_r=6.20$ min) a una concentración de 10ppm.

Utilizando los resultados de la linealidad del sistema y utilizando el criterio de $Y = Y_B + 3S_B$ para el límite de detección y $Y = Y_B + 10S_B$ para el límite de cuantificación, donde Y es la respuesta debida al Amitraz, Y_B es la respuesta cuando no está presente el Amitraz (blanco) siendo ésta la ordenada al origen y S_B es la desviación estándar del blanco (20)

Curva	1	2	3	Promedio
LDD (ppm)	6.20	6.87	5.60	6.22
LDC (ppm)	10.30	11.46	9.17	10.31

LDD Limite de detección

LDC Limite de cuantificación

3.1.4 Linealidad del método (por el método de estándar interno EI)

Se realizaron tres curvas patrón agregando estándar de Amitraz al baño de Tactic® preparado en el intervalo de concentraciones de 0 a 100 ppm a baños de Tactic®, las cuales fueron analizadas para obtener el coeficiente de determinación (r^2), la pendiente (m) y la ordenada al origen (b). En la tabla 3 se muestran los resultados de las tres curvas.

Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
[EA]/[EI](A)	RA	[EA]/[EI](R)	[EA]/[EI](A)	RA	[EA]/[EI](R)	[EA]/[EI](A)	RA	[EA]/[EI](R)
*0.00000	0.48380	0.65510	0.00000	0.45650	0.61840	0.00000	0.43670	0.59180
0.07384	0.55670	0.75300	0.07933	0.47310	0.64070	0.07143	0.47670	0.64550
0.14767	0.63410	0.85700	0.15865	0.56440	0.76330	0.14286	0.56310	0.76160
0.29535	0.73380	0.99090	0.31731	0.66950	0.90450	0.28571	0.65330	0.88270
0.44302	0.83360	1.12490	0.47596	0.78530	1.06000	0.42857	0.75180	1.01500
0.59070	0.94750	1.27790	0.63462	0.92880	1.25280	0.57143	0.88980	1.20040
0.73837	1.15910	1.56210	0.79327	1.04010	1.40230	0.71429	0.99010	1.33510
Pendiente (m)		1.1399	Pendiente (m)		1.0204	Pendiente (m)		1.0467
Coeficiente de determinación (r ²)		0.9846	Coeficiente de determinación		0.9956	Coeficiente de determinación		0.9966
Ordenada al origen (b)		0.6588	Ordenada al origen (b)		0.5904	Ordenada al origen (b)		0.5878

[EA] es concentración del estándar de amitraz

[EI] es concentración del estándar interno, escualano

RA es la relación de áreas del EA/EI

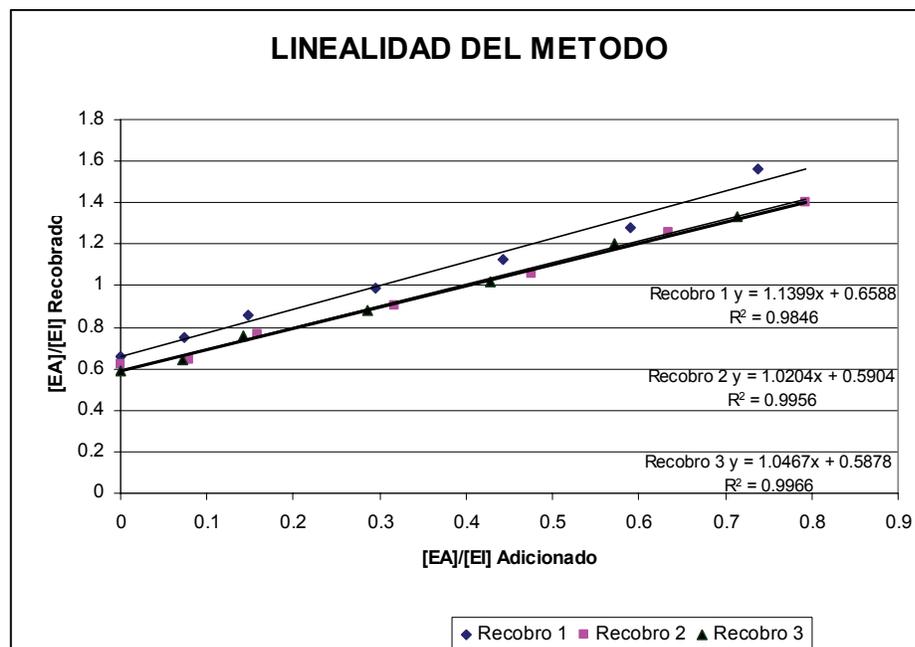
(A) Adicionado

(R) Recobrado

* Este valor es debido a que se utilizo muestra comercial Tactik® como placebo.

Tabla 3. Resultados de la Linealidad del Método de las tres curvas patrón en la que se utiliza para determinar $[EA]/[EI](R)$ la siguiente ecuación de la curva de calibración $RA = 0.7445[EA]/[EI](R) - 0.0039$

En la gráfica 2 se observa la linealidad del método donde en promedio el coeficiente de correlación es mayor a 0.99 para las curvas analizadas.



Gráfica 2. Linealidad del Método. Curvas de calibración en un intervalo de concentración de 0 a 100 ppm.

Utilizando Tactic® como placebo, a una concentración añadida de 0 ppm se obtiene el cromatograma de la figura 7 y a 100 ppm de concentración añadida se presenta en la figura 8.

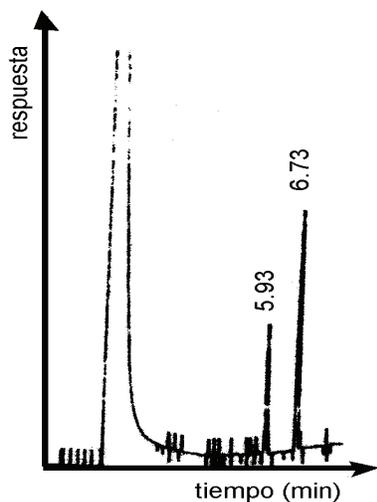


Figura 7. Cromatograma de amitraz ($t_r=5.93$ min) concentración de estándar adicionado 0 ppm y escualano ($t_r=6.73$ min) a una concentración de 133.12 ppm.

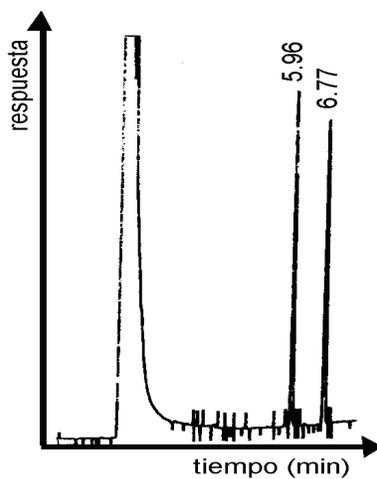


Figura 8. Cromatograma de amitraz ($t_r=5.96$ min) a una concentración de estándar adicionado de 100 ppm y escualano ($t_r=6.77$ min) a una concentración de 133.12 ppm.

III.1.5 Cuantificación de amitraz en las muestras comerciales de Tactic® y Bovitraz® (por el método de estándar interno EI)

Utilizando la ecuación de la curva patrón $y = 0.3678x - 0.0118$ (tabla 2) se obtuvieron los resultados de las concentraciones de amitraz en las muestras. Esta ecuación permite determinar la concentración del analito por la relación de áreas del Amitraz y del EI (y) con la concentración de Amitraz en la muestra problema y del EI con una concentración de 86 ppm

La concentración teórica de Amitraz en los productos comerciales es de 62.5 ppm que representa el 100%. Los resultados de estos experimentos que se realizaron por duplicado se presentan en la tabla 4.

Muestra	RA	Concentración (ppm)	Porcentaje (%)	Promedio
Tactic® m-1	0.3062	74.35	118.96	119.64
Tactic® m-2	0.3095	75.12	120.32	
Bovitraz® m-1	0.2936	71.40	114.24	115.03
Bovitraz® m-2	0.2978	72.38	115.81	

RA es la relación de áreas del Amitraz y del estándar interno, escualano (EA/EI)

Tabla 4. Resultados del contenido de amitraz en los productos comerciales Tactic® y Bovitraz®

En las figuras 9 y 10 se muestran los cromatogramas obtenidos de las valoraciones de Tactic® y de Bovitraz®.

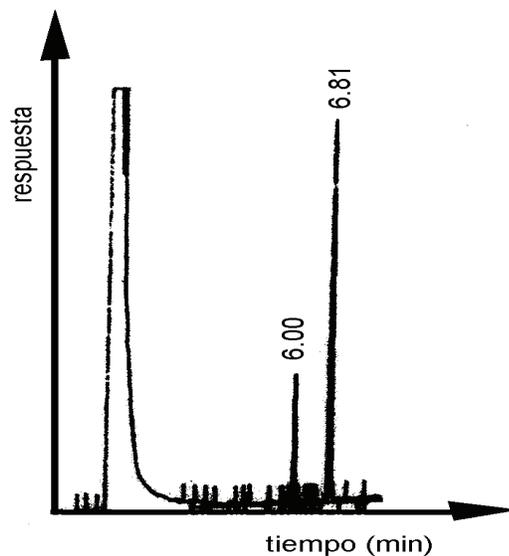


Figura 9. Cromatograma de amitraz ($tr=6.00$ min) y escualano ($tr=6.81$ min) en la muestra de Tactic®

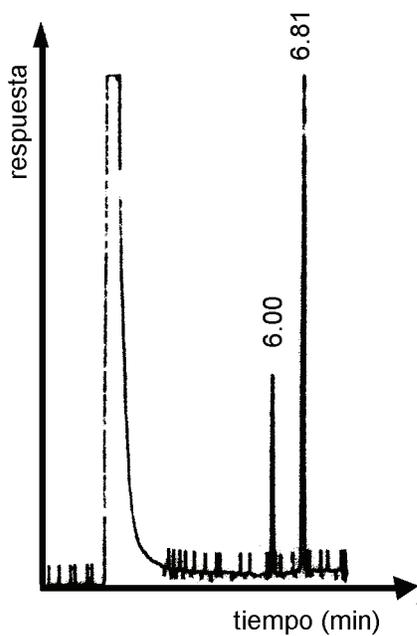


Figura 10. Cromatograma de amitraz ($tr=6.00$ min) y escualano ($tr=6.81$ min) en la muestra de Bovitraz®.

III.1.6 Recobro

El recobro se realizó utilizando baños de Taktic® y adicionando diferentes volúmenes de una disolución “stock” de amitraz de concentración de 500 ppm. Para determinar el porcentaje de recuperación de Amitraz en baños de Taktic® se utilizaron los datos de la linealidad del método (tabla 3).

Se utilizaron 10 ml del baño de Taktic®. La concentración teórica final de la disolución de amitraz es de 95.712 ppm según la valoración obtenida del producto terminado tabla 4.

En la ecuación de la linealidad del método **al no adicionar estándar de amitraz** (EA=0) la disolución presenta una respuesta (RA_A/RA_{EI}) debida a la presencia del analito de interés en el producto comercial. La ordenada al origen es la relación de concentraciones de Amitraz y del estándar interno en la muestra. Con el dato de la concentración del EI se puede determinar la concentración del Amitraz recuperado, es decir, el porcentaje de recobro del principio activo en el método de extracción propuesto. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Recobro	1	2	3
Concentración EI (ppm)	137.6	133.12	143.36
b	0.6588	0.5904	0.5878
m	1.1399	1.0204	1.0467
r ²	0.9846	0.9956	0.9966
Concentración (ppm)	90.65	78.59	84.26
Recobro (%)	94.72	82.11	88.04

EI = estándar interno. b = ordenada al origen m = pendiente.

r²= coeficiente de determinación

Tabla 5. Recobro de Amitraz en baños de Taktic®, donde el promedio de los tres análisis es 88.29 %.

III.1.7 Análisis cuantitativo de Amitraz en los baños de Taktic® y Bovitraz® en presencia de lodo.

Para determinar la cantidad de tierra a utilizar se realizaron anticipadamente algunas pruebas modificando la cantidad y el tiempo de agitación. La cantidad de lodo adicionada es de 1g en 10 mL del baño y se agita durante 5 minutos.

Los resultados obtenidos para Taktic® se presentan en la tabla 6 y para Bovitraz® en la tabla 7.

TAKTIC®

	1	2	3
RA	0.5136	0.5185	0.5015
Cantidad recuperada (ppm)	88.11	88.95	86.02
%obtenido¹	92.06	92.94	89.88
%obtenido²	104.27	105.27	101.80

RA relación de áreas de la muestra/área del estándar interno

¹ calculado de acuerdo a la valoración del producto (119.64%)

² calculado de acuerdo al recobro en baños del producto (88.29%)

$y = 0.7554x$ [E]=129.6 ppm

Tabla 6. Cantidad de Amitraz recuperado en baños de Taktic® con adición de lodo.

BOVITRAZ®

	1	2	3
RA	0.4325	0.4441	0.4279
Cantidad recuperada (ppm)	90.7	93.13	89.73
%obtenido¹	98.57	101.21	97.51
%obtenido²	111.64	114.63	110.44

RA relación de áreas de la muestra/estándar interno

¹ calculado de acuerdo a la valoración del producto (115.03%)

² calculado de acuerdo al recobro en baños del producto (88.29%)

$y = 0.6104x$ [EI]=128 ppm

Tabla 7. Cantidad de amitraz recuperada en baños de Bovitraz® con adición de lodo.

En la figura 11 se muestra un cromatograma obtenido del análisis cuantitativo de Taktic® adicionado con lodo como posible interferencia en la disminución de la concentración de Amitraz como principio activo en el baño para ganado y en la figura 12 para Bovitraz®, realizando el mismo estudio de interferencia.

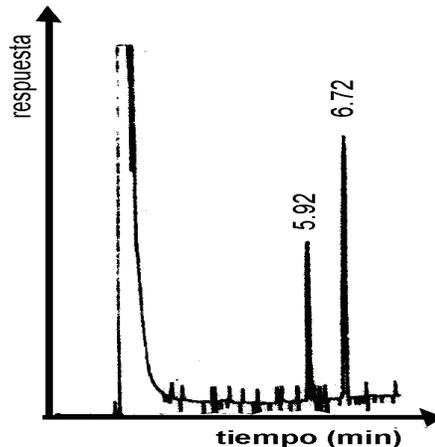


Figura 11. Cromatograma de amitraz ($t_r=5.92$ min) y escualano (6.72min) en baños de Taktic® en presencia de lodo.

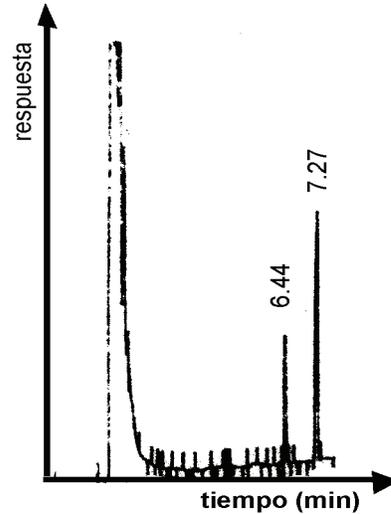


Figura 12. Cromatograma de amitraz ($t_r=6.44$ min) y escualano ($t_r=7.27$ min) en baño de Bovitraz® en presencia de lodo.

III.1.8 Análisis cuantitativo de Amitraz en baños de Tactic® y Bovitraz® en presencia de estiércol.

Se adicionan 0.5 g de estiércol a 10 mL de los baños de Tactic® y Bovitraz® y se agitaron por 5 minutos para después continuar con el procedimiento descrito en el diagrama 1. Las tablas 8 y 9 muestran los resultados obtenidos.

TAKTIC®

	1	2	3
RA	0.3417	0.3385	0.3459
Cantidad recuperada (ppm)	87.89	87.07	88.97
%obtenido¹	91.83	90.97	92.95
%obtenido²	104.01	103.04	105.28

RA relación de áreas de la muestra/área del estándar interno

¹ calculado de acuerdo a la valoración del producto (119.64%)

² calculado de acuerdo al recobro en baños del producto (88.29%)

$y=0.5362x$ [E]=137.92 ppm

Tabla 8. Cantidad obtenida de Amitraz en baños de Tactic® con adición de estiércol.

BOVITRAZ®

	1	2	3
RA	0.468	0.4579	0.4605
Cantidad recuperada (ppm)	89.7	87.76	88.26
%obtenido¹	97.48	95.37	95.91
%obtenido²	110.41	108.02	108.63

RA relación de áreas de la muestra/ área del estándar interno

¹ calculado de acuerdo a la valoración del producto (115.03%)

² calculado de acuerdo al recobro en baños del producto (88.29%)

$y = 0.7130x$ [EI]=136.64 ppm

Tabla 9. Cantidad obtenida de Amitraz en baños de Bovitraz® con adición de estiércol.

En la figura 13 se muestra un cromatograma obtenido del análisis cuantitativo de Tactic® adicionado con estiércol como posible interferencia en la disminución de Amitraz como principio activo en baños para ganado y en la figura 14 para Bovitraz® realizado el mismo estudio de interferencia.

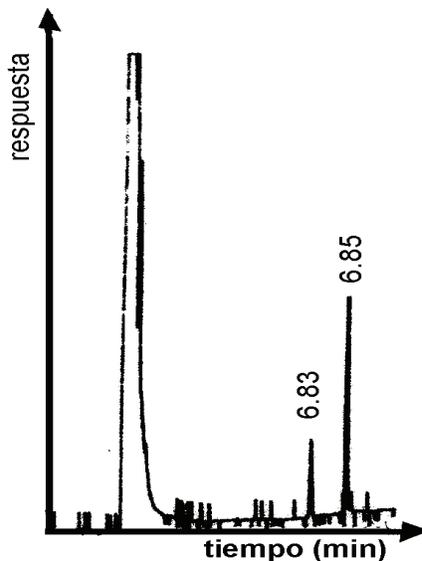


Figura 13. Cromatograma de amitraz (tr=6.83 min) y escualano (tr=6.85 min) en baños de Tactic® en presencia de estiércol.

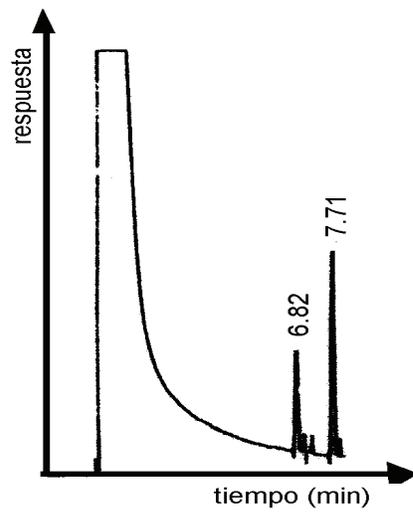


Figura 14. Cromatograma de amitraz ($t_r=6.82$ min) y escualano ($t_r=7.71$ min) en baños de Bovitraz® en presencia de estiércol.

Capítulo IV

Análisis de resultados

Los Cromatogramas de las figuras 1 y 2 (Pag. 20) son comparativos para determinar las condiciones óptimas de operación Cromatográfica, en cuanto al cromatograma de la figura 2, presenta un tiempo de retención de Amitraz mas bajo que el de la figura 1 además que el coleo del disolvente ya no interfiere con el pico de Amitraz, como se observa en la figura 2.

El límite de detección promedio de tres determinaciones es de 6.22 ppm, valor de concentración muy por debajo de la reportada en la etiqueta del producto comercial.

El límite de cuantificación promedio de tres determinaciones es de 10.31 ppm que de igual forma que en el límite de detección está muy por debajo de la concentración reportada en el marbete, además, los dos límites (detección y cuantificación) están por debajo de la concentración a determinar en el experimento.

La linealidad del sistema se realizo utilizando el factor de correlación de tres curvas patrón, el cual estuvo por encima de 0.98, lo que indica que la respuesta de Amitraz se comporta linealmente conforme se incrementa la concentración, dentro de un intervalo de 10 a 120 ppm.

Es importante mencionar que aunque una de las tres curvas presenta diferente pendiente, la relación de respuestas contra relación de concentración es lineal en todo el intervalo, en que se realizó el estudio.

Para probar estadísticamente si hay relación lineal entre la concentración y la respuesta del analito determinado, se realizó una prueba de hipótesis de asociación (20), donde se establecen los siguientes datos:

$$H_0 : \rho = 0 \quad \alpha = 5\% \quad t_{\text{teórica}} = \pm 2.571$$

$$t = r \frac{\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

Ha : $\rho \neq 0$ n =7

Curva	1	2	3
r	0.9993	0.9992	0.9995
t exp	60.40	56.66	69.91
Ho (decision)	rechazo	rechazo	rechazo

Se rechaza la Hipótesis nula (Ho) dado que el valor de la “t” experimental es mayor que la obtenida de tablas, por lo que se acepta la hipótesis alterna (Ha) de relación lineal, cuanto mayor es el valor de “t” experimental mayor es la relación lineal entre la concentración y la respuesta.

Posteriormente se determinó si el valor de correlación lineal (r) de los datos estadísticos de las curvas es significativamente igual a 0.99 con un nivel de significancia de 0.05 o 5% para poder decir que la linealidad es adecuada para el experimento. Por lo que se realizó la siguiente prueba de hipótesis:

Ho : $\rho = 0.999$ $\alpha = 5\%$

Ha : $\rho \neq 0.999$ Z teórica = ± 1.96

$$Z = \left[\left(\frac{n-3}{2} \right) \ln \left(\frac{(1+r)(1-p)}{(1-r)(1+p)} \right) \right]$$

Linealidad del sistema			
Curva	1	2	3
r	0.9993	0.9992	0.9995
Z exp	0.38	0.25	0.67
Ho (decision)	Acepto	Acepto	Acepto

Dado que la Z experimental se encuentra dentro del rango de aceptación de la Z teórica se decide que la Hipótesis nula se acepta y que el valor promedio de correlación lineal (r) es significativamente igual a 0.999 con un nivel de significancia del 5%.

Comentario [r1]: Cual esta dentro del rango? Esta fuera

La linealidad del método se evaluó realizando tres curvas patrón utilizando estándar de Amitraz y muestra de Tactic® obteniéndose como resultado un factor de correlación promedio mayor de 0.99 lo cual indica que sí hay linealidad del método, no consideramos forzosamente un valor de r de 0.999 como en la linealidad del sistema porque se está trabajando con una emulsión y se tiene un mayor grado de error que una solución. Se recurrió a una prueba estadística llamada prueba de hipótesis de asociación que nos indica si cada valor de respuesta está explicado por la concentración. Se obtuvo una pendiente promedio de 0.931

Para probar que hay relación lineal se realizó la siguiente prueba de hipótesis:

Ho : $\rho = 0$ $\alpha = 5\%$

Ha : $\rho \neq 0$ t teórica = ± 2.571

$$t = r \frac{\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

Curva	1	2	3
r	0.9923	0.9978	0.9983
t exp	17.87	33.65	38.47
Ho (decision)	rechazo	rechazo	rechazo

Se rechaza la hipótesis nula debido a que el valor de “t” experimental es mayor que la “t” teórica y como mencioné anteriormente tanto mayor es el valor, mayor es la asociación.

Para determinar si esa asociación es de alrededor de 0.99 con un nivel de significancia de 0.05 o del 5%; se realizó la siguiente prueba de hipótesis:

$$H_0 : \rho = 0.99 \quad \alpha = 5\% \quad Z = \left[\left(\frac{n-3}{2} \right) \ln \left(\frac{(1+r)(1-p)}{(1-r)(1+p)} \right) \right]$$

$$H_a : \rho \neq 0.99 \quad Z \text{ teórica} = \pm 1.96$$

Curva	1	2	3
r	0.9923	0.9978	0.9983
Z exp	0.26	1.52	1.79
Ho (decision)	Acepto	Acepto	Acepto

La hipótesis nula se acepta para un valor de significancia del 5% dado que el valor “Z” experimental se encuentra dentro de la zona de aceptación, por lo que se dice que el coeficiente de correlación es significativamente igual a 0.99.

La determinación de Amitraz en los productos comerciales de Tactic® y de Bovitraz®, en la presentación de concentrados emulsificables (C.E), se realizó analizando dos muestras de cada producto, obteniéndose resultados que sobrepasan los límites especificados en la Farmacopea Veterinaria (94-106%) (21). Para Tactic® fue de 119.64% y para Bovitraz® de 115.03%. Estos resultados pueden atribuirse a las condiciones de almacenaje, donde algunos de sus excipientes orgánicos se volatilizaron y las muestras se concentran. En los objetivos del trabajo no estaba considerada esta situación, por lo que solo se reporta lo determinado.

El recobro del método de extracción propuesto se realizó mediante tres curvas patrón, el resultado es de 81.85% que si bien no se trata de un método con un valor por arriba del 90%, es importante considerar que la extracción del principio activo requiere de varios pasos, en los cuales existe una emulsión de donde se tiene que extraer el principio activo lo que representa pérdida. Sin embargo, es importante conocer este

dato de recobro para tomarlo en cuenta durante las extracciones de Amitraz en los productos comerciales en presencia de lodo o estiércol.

De los agentes extraños que se consideraron que afectan la concentración final de Amitraz en los baños para ganado, el lodo y el estiércol se consideran de mayor importancia porque son los principales contaminantes de los baños.

Para determinar si hay adsorción de Amitraz en lodo o estiércol de los productos comerciales Tactic® y Bovitraz® se realizó la siguiente prueba de hipótesis (21):

Ho: $\mu_1 - \mu_2 = 0$ $\alpha = 5\%$

Ha: $\mu_1 - \mu_2 \neq 0$ $t_{teórica} = \pm 2.776$

gl = $n_1 + n_2 - 2$

$$f_t = \frac{(X_1 - X_2)}{Sp \sqrt{\left(\frac{\sigma_1^2}{n_1}\right) + \left(\frac{\sigma_2^2}{n_2}\right)}}$$

Comentario [r2]: Falta formula

$gl = n_1 + n_2 - 2$

$$S_p^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 2)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Donde la media poblacional 1 (μ_1) es la del recobro y la media poblacional 2 (μ_2) es la cantidad de Amitraz recuperada en Tactic® o Bovitraz® en presencia de lodo o estiércol.

$\mu_1 = 84.50\%$

Lodo	Media	DE	n	t exp	Ho (decisión)
Recobro	84.50	7.14	3		
Tactic®	91.63	1.72	3	0.6528	Acepto
Bovitraz®	99.10	1.92	3	0.6272	Acepto

Se acepta la hipótesis nula debido a que los valores de t experimental se encuentran dentro del rango de aceptación de esta hipótesis ($t_{teórica} = \pm 2.776$) y nos indica que las medias estadísticas no son significativamente diferentes.

Para realizar la prueba con estiércol se siguió el mismo procedimiento estadístico que para lodo y se realiza la siguiente prueba de hipótesis:

$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$ $\alpha = 5\%$

$H_a: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$ $t_{teórica} = \pm 2.776$

$gl = n_1 + n_2 - 2$

Estiércol	Media	D.E.	n	t exp	Ho (decisión)
Recobro	84.50	7.14	3		
Tactic®	91.92	1.08	3	0.7329	Acepto
Bovitraz®	96.25	1.14	3	0.7256	Acepto

Comentario [r3]: Falta formula

Se acepta la hipótesis nula debido a que como en el caso anterior el valor de la t experimental está dentro del rango de aceptación de esta hipótesis

CONCLUSIONES

- Uno de los grandes problemas que tienen los ganaderos del país, es poder determinar la concentración del principio activo en los baños que se utilizan para combatir las garrapatas en el ganado, por lo que se requiere que el análisis cuantitativo para el analito de interés sea llevado a cabo de manera rápida y precisa.
- Se propone un método para llevar a cabo dicho análisis. El método desarrollado demostró ser adecuado para realizar el experimento en el intervalo de trabajo. En general los parámetros que permiten determinar la confiabilidad del método de análisis propuestos son aceptables.
- En cuanto al tiempo de análisis, se requiere de aproximadamente de 2 horas desde la extracción del principio activo hasta la cuantificación. De aplicarse a futuro esta técnica se recomienda optimizar el tiempo de extracción dado que es ahí donde se consume la mayor parte del tiempo.
- Se observó que no hay adsorción, dado que la cantidad de Amitraz recuperada en presencia de lodo o estiércol no es significativamente diferente a la cantidad de Amitraz recuperada. En base a estos resultados obtenidos, podemos concluir que no hay evidencia de adsorción de amitraz en los baños de Taktic® o Bovitraz®.
- En próximos trabajos, se sugiere que el experimento se enfoque en la sedimentación del Amitraz por agentes extraños (lodo, estiércol o pelo del animal) a la cantidad recomendada para los baños de Taktic® o Bovitraz®.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Solorio-Rivera, J.L., Rodríguez-Vivas R.I. Epidemiología de la babesiosis bovina. Componentes Epidemiológicos.
<http://www.uady/~biomedic/rb9781.html>
- 2) Taktic, Manual para su óptimo funcionamiento. Hoech Roussel Vet.
- 3) Solorio-Rivera, J.L., Rodríguez-Vivas, R.I. Epidemiología de la babesiosis bovina. II. Indicadores Epidemiológicos y elementos para el diseño de estrategias de control. Rev. Biomed. 1997; 8(2)
- 4) Machin, M.V and McDougall, K.W. FBC Limited Chesterford Park Research Station. Saffron Walden, Essex CB10 1XL. Registration Document Amitraz/ R177. Determination of Amitraz in cattle dipping baths and sprays.
- 5) FBC Limited Chesterford Park Research Station. Analytical Method for Amitraz in lime-stabilised sheep dip samples.
- 6) Rodríguez-Vivas, R.I., Domínguez-Alpizar, J.L. Grupos entomológicos de importancia veterinaria en Yucatán, México. Rev. Biomed. 1998; Volumen 9(1): 26-37.
- 7) Merk Sharp & Dohme y Aventis. Control de las Enfermedades Parasitarias de los Bovinos: Parásitos Externos: Garrapata.
<http://ar.merial.com/producers/beef/garrapata.html>
- 8) Vanzini, V., Mangold, A. y Guglielmone, A. Modelo técnico-económico para la prevención de la babesiosis y la anaplasmosis de los bovinos en la ganadería de cría extensiva. Producir XX1. Año 9. Nro 100. Febrero 2000. Pagina 20. <http://rafaela.inta.gov.ar/revistas/pxx10200.htm>
- 9) Insecticidas Acariciadas para Control de Plagas en Cultivos de Papaya

- 10) Wayland J. Hayes, Jr. Eduard R. Laws Handbook of Pesticide Toxicology Volumen 3 Classes of Pesticides Miscellaneous Pesticidas Chapter 22 (1486-1491) Academic Press, Inc. 1991
- 11) Pierpoint, Anthony C., Hapeman, Cathleen J. and Torrents, Alba. J.Agric. Food Chem. 45 (1997) 1937-1939.
- 12) Corta, E., Bakkali, A., Berrueta, L.A B.Gallo y Vicente, F. Talanta 48 (1999) 189-199.
- 13) Rojas Escudero,E. y Elizalde Galván P. Curso de Cromatografía de gases
- 14) Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 7ª Edición. 2000 Páginas 226-237
- 15) J.E. George, R.B. Davey, E.H. Ahrens,J.M. Pound, R.O. Drummond. Efficacy of Amitraz (Tactik 12.5% EC) as a dip for the control of Boophilus microplus (canestrini)(Acari: Ixodidae) on cattle Preventive Veterinary Medicine 37 (1998) 55-67
- 16) Sicbaldi, F., Sarra, A., Mutti, D. y Bo, P.F. Use of Gas –liquid chromatography with electron-capture and thermionic-sensitive detection for the quantitation and identification of pesticide residues. Journal of Cromatography A765 (1997) 13-22
- 17) Hans-Jürgen Stan, Manfred Linkerhägner. Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with atomic emission detection state-of- the –art use of modified multimethod S19 of the Deutsche Forschungsgemeinschaft and automated large-volume injection with programmed-temperature vaporization and solvent venting. Journal of

Chromatography A 750 (1996) 369-390.

- 18) FBC Limited Hauxton Cambrige. The determination of Amitraz in 12.5% w /v (125g/L) EC Formulations By Gas Chromatography (GC).
- 19) Miller,J.C., Miller J.N. Estadística para Química Analítica Editorial Addison Wesley.
- 20) R.E Walpole., R.H Myers. Probabilidad y estadística para ingenieros Editorial Interamericana ,3^a Edición 1986. pag. 397,385-400.
- 21) British Pharmacopoeia (Veterinary) 2004 Pág. 99.

. GLOSARIO

Absorción	Proceso en el que una sustancia penetra y se difunde regularmente en otra.
Acaros	Artrópodos de la clasificación de arácnidos, de tamaño y cuerpo globoso. Poseen un aparato bucal adaptado específicamente al tipo de alimentación (picadura o succión). Son parásitos temporales o permanentes de vegetales y animales (Ej. garrapatas, arador, etc.).
Acaricidas	adj. Que elimina los ácaros. Plaguicidas
Amitraz	Plaguicida, acaricida.
Babesiosis	Enfermedad protozoaria transmitida por garrapatas.
Anaplasmosis	Enfermedad protozoaria transmitida por garrapatas.
Bobitraz®	Nombre comercial de un producto que contiene amitraz.
Boophilus microplus	Especie de garrapata.
Cromatografía de Gases	Técnica analítica de separación y cuantificación donde los componentes de una muestra se distribuyen entre dos fases: una estacionaria y una móvil que es un gas que pasa a través de la fase estacionaria.
Cromatografía de Líquidos	Técnica analítica de separación y cuantificación donde los componentes de una muestra se distribuyen entre dos fases: una estacionaria y una móvil que es un líquido

que pasa a través de la fase estacionaria a alta presión.

Especificidad	Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.
Exactitud	La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el por ciento de recobro.
Hábitat	Parte del entorno definida por un conjunto de factores físicos, en la que vive un Individuo, una población, una especie o un grupo de especies.
Limite de detección	Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones de operación establecidas.
Linealidad	La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro del intervalo determinado.
Precisión	La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales

cuando el procedimiento se aplica repetidamente diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto, usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad método analítico bajo las condiciones normales de operación.

Recobro	Es el por ciento obtenido del análisis de muestras a las que se las ha adicionando cantidades conocidas de la muestra.
Resistencia	Capacidad que tienen los organismos de crear resistencia a agentes químicos cuando estos se aplican de forma inadecuada.
Selectividad	Porcentaje de moléculas de una especie química que ha experimentado una transformación y ha formado un producto determinado.
Estándar	Sustancia químicamente pura.
Taktic®	Nombre comercial de un producto que contiene como principio activo amitraz
Vectores	Sistemas biológicos que transportan microorganismos y que por lo tanto ayudan a su distribución

ABREVIATURAS

- P/P: peso -peso
- P/V: peso -volumen
- AED Detector de emisión atómica
- CG Cromatografía de gases
- CL: cromatografía de líquidos
- MS: detector de masas
- pH.: potencial de hidrogeno
- CE: concentrado emulsificable
- g: gramos
- ml: mililitros
- Kg: kilogramos
- ppm: partes por millón
- mg: miligramos
- r: factor de correlación
- Frr: factor de respuesta relativa
- E.I.: estándar interno
- min. minutos
- S/R: sin considerar el recobro
- C/R: considerando el recobro
- Ho: Hipotesis nula
- Ha: Hipotesis alterna
- n: tamaño de muestra
- t: "t" de student
- α nivel de significancia
- gl grados de libertad