



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTABLECIMIENTO DE UN MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN
DE IXODICIDAS EN BAÑOS DE INMERSIÓN**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA

PRESENTA

MARÍA GUADALUPE JAVIER ALONSO



MÉXICO, D.F.

AÑO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor Francisco Rojo Callejas

VOCAL: Profesora Elba Rojas Escudero

SECRETARIO: Profesora Silvia Citlalli Gama González

1er SUPLENTE: Profesor Adrián De Santiago Zárate

2o SUPLENTE: Profesor Miguel Ángel Delgadillo Marín

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 102, SÓTANO EDIFICIO B, DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA: M. EN C. FRANCISCO ROJO CALLEJAS

SUSTENTANTE: MARÍA GUADALUPE JAVIER ALONSO



ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1-2
II. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo principal	3
2.2 Objetivos particulares	3
III. ANTECEDENTES	4-47
3.1 Plagas.....	4
3.1.1 Las garrapatas	6
3.1.1.1 Rhipicephalus microplus.....	9
3.1.1.2 Ciclo biológico de la garrapata Rhipicephalus (Boophilus) microplus	11
3.1.1.3 Pérdidas económicas debido a las garrapatas.....	12
3.2 Control de plagas en ganado bovino	13
3.2.1 Métodos de control	13
3.2.1.1 Control biológico	13
3.2.1.2 Control químico	13
3.2.1.3 Control inmunológico.....	15
3.2.1.4 Control cultural.....	16
3.2.1.5 Métodos de aplicación de ixodicidas para el control de las garrapatas	16
3.3 Amitraz.....	18
3.3.1 Propiedades Físicas y Químicas.....	18
3.4 Espectrofotometría	21
3.4.1 Principios Básicos	21
3.4.2 Colorimetría	24
3.5 Cromatografía.....	25
3.5.1 Cromatografía de Gases	26
3.5.1.1 Los componentes fundamentales de un cromatógrafo de gases.....	26
3.5.1.2 Requisitos y características de los componentes del cromatógrafo de gases	27



3.6 Espectrometría de masas	30
3.7 Validación	36
3.7.1 Definición	36
3.7.2 Utilidad	36
3.7.3 Parámetros de desempeño.....	38
3.7.3.1 Definiciones de los parámetros de validación	39
IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL	48-53
4.1 Material, reactivos y equipo	48
4.1.1 Material.....	48
4.1.2 Reactivos.....	48
4.1.3 Equipo.....	49
4.2 Metodología.....	50
4.2.1 Método de laboratorio por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS)	50
4.2.2 Método de campo por UV/Vis	50
4.2.3 Linealidad del sistema	51
4.2.4 Repetibilidad y estabilidad	51
4.2.5 Efectos de la matriz en los baños de inmersión simulados....	52
4.2.6 Cuantificación de Amitraz en muestras enriquecidas.....	52
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54-74
5.1 Método de laboratorio por GC/MS.....	54
5.1.1 Estabilidad de la muestra.....	54
5.1.2 Linealidad del sistema	54
5.1.3 Especificidad	56
5.1.4 Límite de detección.....	58
5.1.5 Efecto de la matriz y linealidad del método (Exactitud en el intervalo de calibración).....	60
5.1.6 Reproducibilidad intermedia	62
5.1.7 Repetibilidad	63
5.2 Método de campo por UV	64
5.2.1 Selección de la longitud de onda de máxima absorción.....	64
5.2.2 Linealidad del sistema	64
5.2.3 Repetibilidad	66
5.2.4 Límite de detección.....	67



5.2.5 Efectos de la matriz	69
5.2.6 Exactitud	70
5.2.7 Exactitud y efectos de la matriz por UV mediante la linealidad del método.....	73
VI. CONCLUSIONES	75-76
VII. BIBLIOGRAFÍA	77-81
VIII. ANEXOS.....	82-89
8.1 Anexo A: Conceptos	82
8.2 Anexo B: Forma de preparación de los baños de inmersión para el ganado bovino.....	86
8.3 Anexo C: Calibración de material de vidrio	87
8.4 Anexo D: La clasificación según Linneo para la garrapata	89



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de los ácaros.....	5
Figura 2. Pata de un ácaro.....	5
Figura 3. Segmentación, denominación de las diferentes partes del cuerpo de los ácaros.....	8
Figura 4. Distribución geográfica del programa control y erradicación de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> en México.....	10
Figura 5. Ciclo biológico de <i>Boophilus microplus</i>	11
Figura 6. Formas de aplicación de ixodicidas en el ganado bovino.....	17
Figura 7. Fórmula química desarrollada del Amitraz.....	18
Figura 8. Esquema de un espectrofotómetro.....	23
Figura 9. Clasificación general de la cromatografía.....	26
Figura 10. Esquema de un cromatógrafo de gases.....	27
Figura 11. Componentes de un espectrómetro de masas.....	31
Figura 12. Cuadrupolo de un espectrómetro de masas.....	32
Figura 13. Esquema de validación de un método.....	38
Figura 14. Tipos de sesgo.....	43
Figura 15. Espectro de absorción de Amitraz en H ₂ O/THF (5:95 % v/v)...	64

ÍNDICE DE CROMATOGRAMAS

Cromatograma 1. Estándar de Amitraz de concentración de 2mg/mL.....	56
Cromatograma 2. Matriz de una muestra agotada.....	57
Cromatograma 3. Matriz enriquecida con 2 mg/mL de estándar de Amitraz.....	58
Cromatograma 4. Ruido de fondo en las cercanías del pico de Amitraz, para una muestra enriquecida.....	59
Cromatograma 5. Intensidad de la señal de un pico correspondiente a 2 mg/L de Amitraz adicionados a una muestra agotada.....	60

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva de calibración de Amitraz por GC/MS.....	55
Gráfico 2. Residuos de la curva de calibración.....	55
Gráfico 3. Linealidad del método (exactitud) de Amitraz por GC/MS (SIM).....	61
Gráfico 4. Curva de calibración de Amitraz por GC/MS (SIM), mismo método, segundo operador, mismos modelos de equipo y columna ...	62



Gráfico 5. Repetibilidad de los tiempos de retención durante el desarrollo experimental	63
Gráfico 6. Curva de calibración del Amitraz en agua/THF 5:95 % v/v por espectrofotometría UV (λ 314.4 nm)	65
Gráfico 7. Residuos de la curva de calibración de la Gráfico 6	66
Gráfico 8. Variaciones de la pendiente de la curva de calibración	67
Gráfico 9. Límite de detección	68
Gráfico 10. Residuos de la linealidad cerca del límite de detección	69
Gráfico 11. Curva de calibración por adiciones patrón por la técnica de UV	71
Gráfico 12. Evaluación de la exactitud por $C_{añadida}$ y C_{medida} del Amitraz en UV interpolando en la curva de calibración UV	72
Gráfico 13. Evaluación de la exactitud en UV comparando contra la concentración medida por GC/MS	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Las garrapatas de importancia veterinaria	7
Tabla II. Principales plaguicidas, su modo de acción y las sustancias activas	15
Tabla III. Formas de ionización en espectrometría de masas	34
Tabla IV. Parámetros de desempeño	39
Tabla V. Baños simulados	52
Tabla VI. Estabilidad del Amitraz en los baños de inmersión para ganado	54
Tabla VII. Pruebas de hipótesis sobre la ordenada y la pendiente para demostrar la exactitud en la determinación de Amitraz por GC/MS (ausencia de errores sistemáticos)	61
Tabla VIII. Pruebas de hipótesis de comparación entre las dos curvas de calibración de los gráficos 1 y 4 (Reproducibilidad intermedia)	63
Tabla IX. Linealidad del sistema UV	65
Tabla X. Efectos de la matriz en baños simulados	69
Tabla XI. Densidad del agua líquida entre 0 y 100 °C.	87



ABREVIATURAS

FAO: Food and Agriculture Organization por sus siglas en Inglés. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

CICOPLAFEST: Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas.

EPA: Environmental Protection Agency por sus siglas en inglés. Agencia de Protección Ambiental.

λ : Longitud de onda.

pg: picogramos.

T_i : Temperatura inicial.

t_i : tiempo inicial.

dt: diferencia de tiempo.

AOAC: Internacional. Association of Oficial Analytical Chemist por sus siglas en inglés. Asociación Oficial de Químicos Analíticos.

ISO: "Organización Internacional de Normalización" ("International Organization for Standardization", en inglés).

Radiación UV: Radiación Ultravioleta.

INIFAP: Instituto Nacional De Investigación Forestales, Agrícola y Pecuarias.



I. INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores problemas de productividad en la ganadería en México son los ectoparásitos, como la garrapata, y los problemas de salud asociados a ellos. Para combatirlos se usa una gran variedad de agentes ixodicidas. Los más comercializados son principalmente amidinas y plaguicidas organofosforados. Aunque hay pocas pruebas tangibles ^{VII. 1} es sabido que en diversas partes del país también se utilizan diversos plaguicidas cuyo uso está prohibido, principalmente los plaguicidas organoclorados.

El inadecuado control de los tratamientos contra los ectoparásitos del ganado vacuno provoca la resistencia de las garrapatas hacia los ixodicidas. En 1981 se detectó el primer caso de resistencia en la garrapata *Boophilus* a los plaguicidas organofosforados y en 1993 a los ixodicidas piretroides. La principal causa de esta resistencia es la exposición del parásito a niveles bajos del ixodicida, lo que provoca que las generaciones futuras de sobrevivientes sean genéticamente más resistentes.

Desde 1994 se han realizado, a nivel nacional, una serie de acciones tendientes a controlar el problema y entre ellas se pone especial atención a la difusión de los orígenes y consecuencias de la resistencia y a la educación sobre el buen manejo de los ixodicidas entre los usuarios.

Los ixodicidas más usados en la ganadería son el Amitraz y el cymiazol. El Amitraz pertenece a la familia de las amidinas (o formamidinas), estas son una clase especial de sustancias con actividad por contacto, sobre todo contra garrapatas, ácaros y piojos. Su actividad insecticida se descubrió en los años 60's del siglo XX.



En baños de inmersión y en aspersion la disolución garrapaticida, acaricida y piojicida contiene 12.5 % del principio activo.

Los baños de inmersión, pierden efectividad por el uso inadecuado de ixodicidas, lo que puede generar resistencia. El deterioro es multifactorial, entre los principales factores está la fase de preparación en la que se debe de verificar el pH de la disolución (debe de ser de 12 a 14), la dosis adecuada del garrapaticida, cantidad de disolución utilizada por animal, forma de aplicación y la dosis adecuadas de carga y recarga en los baños de inmersión ^{vii. 2}. A estas les podemos incluir la presencia de estiércol y de tierra, otro factor es la degradación a subproductos del ixodicida. El mayor problema para el control en campo de la efectividad del agente ixodicida es que no existe una metodología para poder medir in-situ los niveles del principio activo y con ello tener un control preciso sobre las recargas a los baños de inmersión para el ganado bovino.



II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Desarrollo y validación de un método de campo y un método de laboratorio de referencia, para la cuantificación de ixodicidas en baños de inmersión para ganado.

2.2 Objetivos particulares

- Establecer la metodología para la cuantificación del Amitraz por cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas (GC/MS).
- Establecer las condiciones de análisis del Amitraz por UV/Vis.
- Validación del método propuesto.
- Aplicación del método validado a muestras de baños de inmersión para ganado bovino.



III. ANTECEDENTES

3.1 Plagas

La plaga es cualquier organismo molesto y dañino para el ser humano o sus intereses ^{VII. 3}. La noción de plaga se asocia casi exclusivamente con los insectos y otros artrópodos terrestres (ácaros), aunque dentro de ella deban incluirse también algunos invertebrados no artrópodos (nematodos, gasterópodos), y determinados vertebrados (aves y roedores); no obstante deben excluirse los microorganismos (virus, bacterias) y los hongos, ya que los daños causados por ellos son denominados “enfermedades” ^{VII. 4}.

La plaga de mayor importancia médica y económica es el ácaro ya que excede en individuos como en número de especies. Son un grupo de arácnidos y se diferencian porque tienen el cefalotórax y el abdomen completamente fusionados. Presentan las piezas bucales en una pequeña proyección anterior llamada capitulum o cabeza, que se presenta principalmente los apéndices alimenticios que rodean la boca: a cada lado de la boca se encuentran los quelíceros, cuya forma y función defiere entre las familias: a cada lado de los quelíceros se encuentran los pedipalpos. Las bases de los pedipalpos se fusionan para formar el hipostoma, mientras que el rostro o tectum se extiende sobre la boca. Aparte del capitulum, el resto del cuerpo se conoce como idiosoma (**Figura 1** y **Figura 3**).

Las patas están formadas por tres segmentos: el primer segmento o coxa está soldado a la parte ventral y luego están los segmentos representados por: trocánter y fémur. Corrientemente dividido en basifémur, telofémur, genu, tibia, tarso y apotelos o ambulacro ^{VII. 5} (**Figura 2**). El apotelos, ambulacro o pretarso comúnmente está dividido



en dos partes. En la extremidad del tarso hay un par de uñas grandes, situadas en un pedículo largo, entre las cuales hay un pulvillus. En la cara superior del Tarso hay un hoyuelo cubierto por una membrana, conocida por el nombre de **órgano de Haller** (nombrado en honor a su descubridor). Se supone que sea un órgano auditivo ^{VII. 6.}

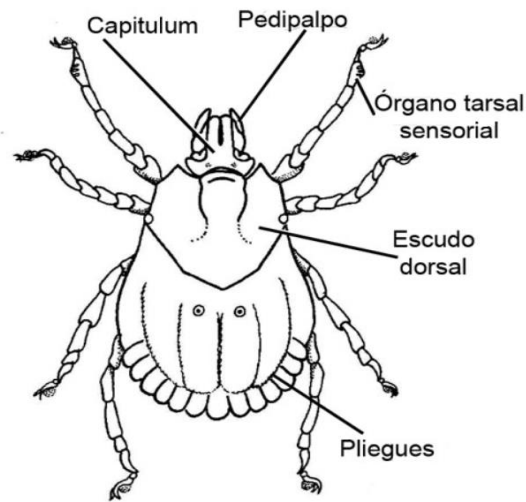


Figura 1. Morfología de los ácaros

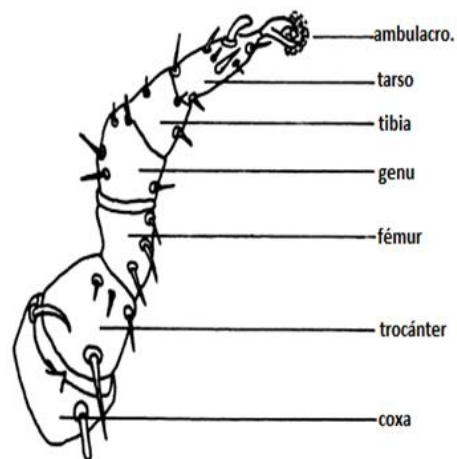


Figura 2. Pata de un ácaro



En las regiones tropicales y subtropicales a nivel mundial las garrapatas, moscas, hematófagas y nematodos gastrointestinales (NGI) son los principales parásitos que causan problemas económicos en el ganado bovino ^{VII. 2}.

3.1.1 Las garrapatas

Las garrapatas son ácaros (Acari) con una piel elástica parecida a la piel humana y pertenecen a la especie de los arácnidos. Se trata de la clase más grande de ácaros. Todo animal de sangre caliente se ofrece como huésped.

Las enfermedades que transmiten, son uno de los principales problemas de salud animal en el ganado bovino, causan pérdidas económicas considerables, además de ser un obstáculo para la introducción a zonas infestadas por este parásito de razas europeas especializadas en producción de leche ^{VII. 7}.

Son ectoparásitos hematófagos, que durante la fase parasitaria pueden transmitir un gran número de patógenos a los hospedadores ^{VII. 8}, prácticamente de todos los vertebrados terrestres (principalmente mamíferos), aves, reptiles y algunos anfibios, aunque han sido considerados parásitos cosmopolitas, numerosas especies están restringidas a regiones (hábitats) específicas ^{VII. 9}. Los ixódidos o las garrapatas se encuentran a lo largo de todo el mundo, pero son más frecuentes en regiones tropicales y subtropicales.

De las garrapatas de importancia veterinaria se reconocen 903 especies y se dividen en tres familias: *Ixodidae*, *Argasidae*, y *Nuttalliellidae*. **(Tabla I)**.

**Tabla I. Las garrapatas de importancia veterinaria**

Familia	No. de Especies
<i>Ixodidae</i>	705
<i>Argasidae</i>	197
<i>Nuttalliellidae</i>	1

Ixodidae: “garrapatas duras”. Presentan un escudo quitinoso duro (escudo prodorsal), que recubre todo el dorso del macho y un tercio o menos de la hembra, según el grado de ingurgitación que presenten. Mientras que el opistosoma solo tiene la cutícula, la que le permite expandirse al alimentarse (**Figura 3**). Tiene sólo tres estadios postembrionarios (larva, ninfa y adulto), necesitando cada uno alimentarse de un hospedador diferente. Esta familia es cosmopolita e incluye 19 géneros y unas 700 especies ^{VII. 7}. Siendo de importancia sanitaria por su capacidad de transmitir organismos patógenos a sus hospedadores.

Argasidae: o “garrapatas blandas”. Carecen de escudo, la placa dura quitinosa que cubre su cuerpo. El aparato bucal de la garrapata blanda adulta no puede observarse desde la cara posterior. Son garrapatas que se alimentan periódicamente de los mismos hospedadores. Se les puede encontrar en nidos, refugios o madrigueras de pájaros o pequeños mamíferos (especialmente murciélagos). A diferencia de los *ixodidae* se alimentan de forma intermitente y muy rápidamente, además pueden permanecer durante mucho tiempo sin ingerir alimento (hasta 11 años, comprobado en una especie). Se les puede encontrar en las regiones tropicales y semitropicales, generalmente en ambientes secos. Existen 5 géneros y más de 150 especies ^{VII. 10}.



Nuttalliellidae: sólo existe *Nuttalliella namaqua* Bedford que vive en el Sur de África. Presenta una mezcla de caracteres entre las dos familias anteriores ^{VII. 10}.

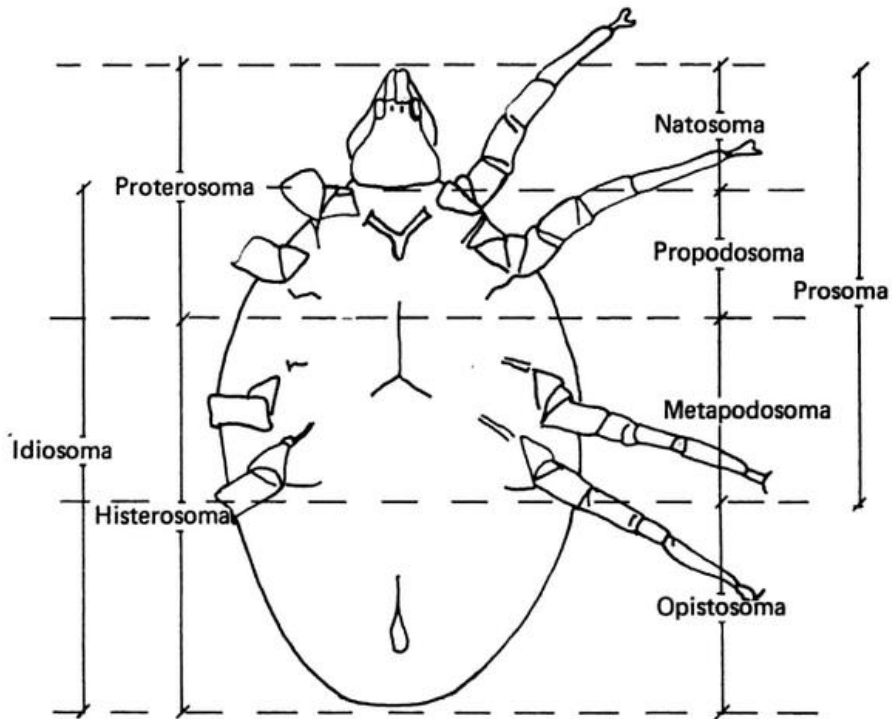


Figura 3. Segmentación, denominación de las diferentes partes del cuerpo de los ácaros

En México se han identificado 77 especies de garrapatas que afectan al ganado bovino y al hombre. En la ganadería bovina nacional las garrapatas de importancia son: *Rhipicephalus microplus*, *R. anulatus*, *Amblyomma cajennense*, *A. imitador*, *A. maculatum*, *A. triste*, *A. americanum* y *Anocentor nitens*. Sin embargo, las tres especies de mayor importancia en México por el daño que causan en el ganado bovino son *R. microplus*, (esta especie de garrapata se verá con más detalle en la pág. 9) *B. annulatus* y *A. cajennense* ^{VII. 2}. La primera, es la



especie más importante debido a su amplia distribución, ocupando del territorio el 53 %, principalmente en zonas del trópico bajo ^{VII. 11}.

3.1.1.1 Rhipicephalus microplus

Anteriormente conocida como *Boophilus microplus*, es considerada la garrapata de mayor interés en el ganado bovino a nivel mundial, ya que esta especie ocasiona problemas que van desde la disminución en la ganancia de peso, alteraciones reproductivas, altos costos de control y depreciación en las pieles, hasta pérdidas por mortalidad de los animales ^{VII. 12}.

Es una garrapata dura que se puede encontrar en diversos huéspedes, entre ellos el ganado bovino, búfalos, caballos, asnos, cabras, ovejas, ciervos, cerdos, perros y algunos animales silvestres. Una alta carga de garrapatas en los animales puede disminuir la producción y dañar a los cueros o a las pieles. También puede transmitir la babesiosis (causada por los parásitos protozoarios *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*) y la anaplasmosis (causada por *Anaplasma marginale*). Bajo condiciones experimentales, puede transmitir *Babesia equina*, que causa la piroplasmosis equina.

Esta garrapata ha sido la principal especie bajo control en las campañas realizadas en México. Por otra parte, la FAO menciona que los costos de control de garrapatas van de 20 a 40 % de la producción total, cerca de 7,000 millones de dólares anuales ^{VII. 2}.

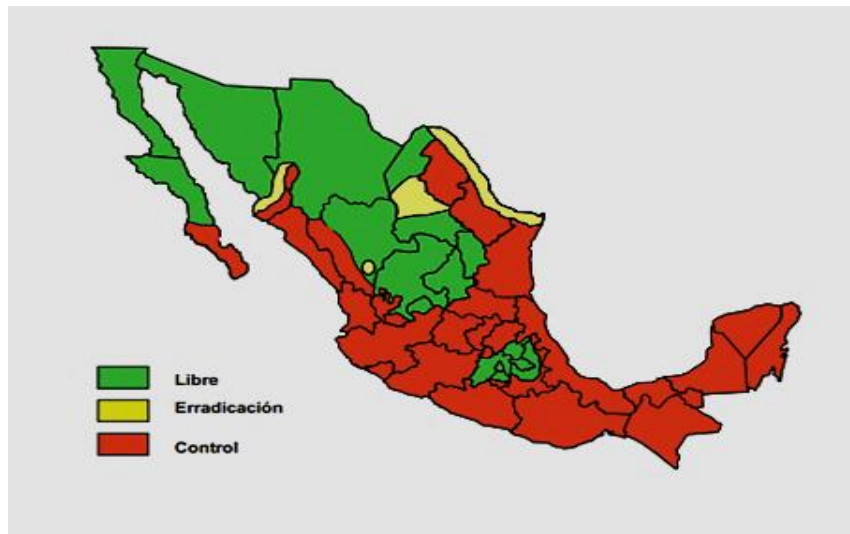


Figura 4. Distribución geográfica del programa control y erradicación de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en México

Se consideran como áreas libres de *Rhipicephalus microplus* parte de los estados de Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Hidalgo, Estado de México, Morelos, Puebla, y en todo el estado de Aguascalientes, Baja California, Tlaxcala, Sonora y el Distrito Federal ^{VII. 13}.

Las áreas en fase de control se encuentran en el sur del territorio nacional y abarcan aproximadamente el 51.5 % de éste. Se encuentran delimitadas por el cordón fitozoosanitario del norte del país que se inicia al noroeste en el litoral del Golfo de Baja California entre los límites de los estados de Sonora y Sinaloa, y termina en el litoral del Golfo de México (**Figura 4**) ^{VII. 7}.



3.1.1.2 Ciclo biológico de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

El ciclo biológico de *Rhipicephalus microplus* (**Figura 5**), se desarrolla en tres fases; la primera es la fase no parasitaria también llamada de vida libre, la cual se desarrolla fuera del hospedador, la segunda es llamada fase de encuentro que se define como el proceso de transferencia de las larvas desde la vegetación al hospedero y la tercer fase es la parasitaria la cual se desarrolla sobre el hospedero ^{VII. 14}.

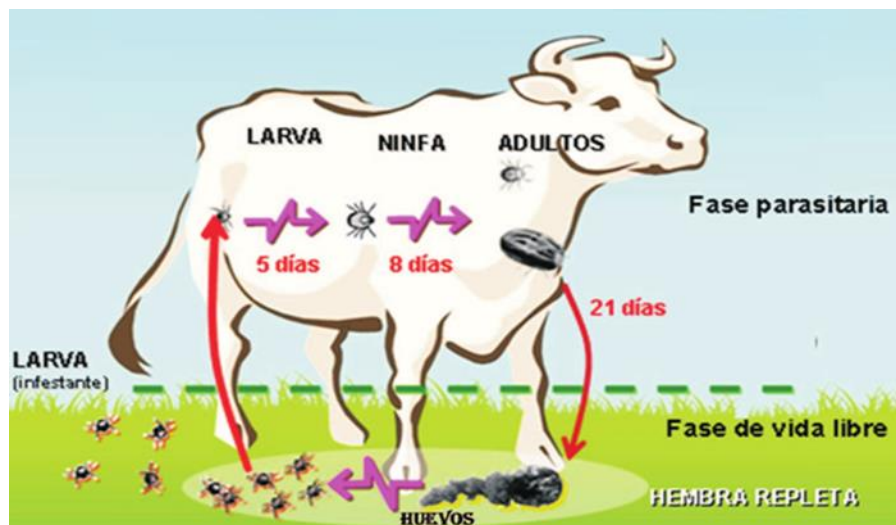


Figura 5. Ciclo biológico de *Boophilus microplus*

El proceso de infestación al animal empieza en las larvas que se encuentran en los pastos esperando al hospedador, cuando sube al bovino, se alimenta de sangre y muda a ninfa, sigue alimentándose y muda a adulto macho (gonandro) y hembra (partenoginas), se aparean y la hembra sigue chupando sangre hasta estar repleta y se transforma en teleogina, aquí abandona al hospedador, busca un lugar protegido en el suelo y comienza la puesta de huevos de 3.500 a 4.000, a partir de los huevos se originan las neo larvas. La duración del ciclo depende de



la temperatura ambiente y oscila entre 20 a 41 días, en promedio 23. Las larvas pueden vivir en el pasto sin alimentarse por 180 días, si las condiciones climáticas son óptimas ^{VII. 14}.

3.1.1.3 Pérdidas económicas debido a las garrapatas

- ❖ Daños a las pieles de un 5 a 10 %.
- ❖ Pérdida de sangre y efecto anoréxico.
- ❖ Disminución en la producción de carne aproximadamente en 15 %, lo que corresponde a una pérdida anual de 25 a 60 kg. de peso vivo
- ❖ Disminución en la producción de leche, entre 15 y 20 %.
- ❖ Transmisión de enfermedades como Anaplasmosis y Babesiosis.
- ❖ Las garrapatas provocan **toxicosis** y parálisis en animales y humanos debido a la presencia de sustancias tóxicas que inoculan al momento de parasitar al hospedero.
- ❖ Disminución de la reproducción (abortos, aumento del intervalo entre partos).
- ❖ Presencia de garrapata *Rhipicephalus microplus* resistente a los ixodicidas, lo que retrasa las metas de avance en las campañas de erradicación.
- ❖ Restricción de la movilización animal.
- ❖ Dificultad para introducir razas altamente productivas en regiones en donde existe garrapata.
- ❖ Debe añadirse el costo de los productos químicos y la mano de obra para el control y tratamiento de enfermedades hemoparasitarias transmitidas ^{VII. 7}.



3.2 Control de plagas en el ganado bovino

3.2.1 Métodos de control

El uso de la tecnología para el control de las garrapatas no ha sido uniforme en todos los países de América. Se han propuesto varias alternativas, entre las que se encuentran: el control biológico, el control químico, el control inmunológico, el control cultural y la rotación de potreros ^{VII. 15}. Estas estrategias se aplican de diferente manera dependiendo la región del país en donde se tenga que erradicar la garrapata.

3.2.1.1 Control biológico

El control biológico es un método que utiliza los principios de control natural de las poblaciones, es decir, que tiende a reducir la población-plaga por medio del incremento de la actividad de los agentes biológicos de mortalidad propios de las especies. En un sentido amplio puede ser definido como la supresión o disminución de una plaga por medio de la introducción, propagación y diseminación de otra.

El género *Boophilus spp*, en la naturaleza tiene enemigos como los hongos, los nematodos y las bacterias entomopatógenos, así como ciertas especies de hormigas y aves, avispas y arañas que las depredan sobre el bovino ^{VII. 16}.

3.2.1.2 Control químico

La estrategia más utilizada para el control de las garrapatas consiste en la aplicación de acaricidas o garrapaticidas sobre el cuerpo de los



animales infestados en intervalos específicos, que se determinan por la región ecológica, las especies a las que se va a combatir y la eficiencia residual del garrapaticida, a través de la supervisión de baños de línea y estaciones cuarentenarias ^{VII. 13}.

En México la autoridad que regula a los plaguicidas es la CICOPAFEST que fue creada a través del decreto publicado en el Diario Oficial de la Federación (DOF) el día 15 de octubre de 1987 ^{VII. 17}.

Un plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destine a controlar una plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas y de animales, así como las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal. Alterando los sistemas ecológicos ^{VII. 18}.

El uso indiscriminado de plaguicidas en garrapatas ha contribuido al desarrollo de resistencia, que aparece por selección genética ^{VII. 15}.

Actualmente existen seis grupos de productos químicos que se utilizan para el control de las garrapatas en México, de los cuales se describen su acción garrapaticida y las sustancias activas que los componen en la

Tabla II.



Tabla II. Principales plaguicidas, su modo de acción y las sustancias activas

Plaguicidas	Modo de acción	Sustancia activa
Organofosforados	Por contacto.	Diazinón, Coumafós, Triclorfon y Clorpirifos.
Piretroides	Producen parálisis de los insectos, son sumamente versátiles pero de baja toxicidad y rápido metabolismo en mamíferos.	Cypermctrina, Deltametrina y Permetrina.
Amidinas	Actúan por contacto, teniendo la ventaja de su baja toxicidad y residualidad para los mamíferos.	Amitraz.
Endectosidas o Lactonas macrocíclicas	Son compuestos sistémicos que tienen un amplio espectro de acción para endo y ectoparásitos que se alimentan de sangre y líquidos tisulares del huésped.	Abamectina y Doramectina.
Fenilpirazolonas	Bloquean el ion del cloruro que canaliza la acción del GABA-regulador en las membranas de la célula nerviosa.	Fipronil es la sustancia activa usada para el control de la garrapatas en formulación "pour on", lo que permite que penetre en la cutícula de los ectoparásitos.
Inhibidores del desarrollo	Inhibidores de las mudas y del crecimiento. Este compuesto reduce la capacidad reproductiva de las garrapatas y lentamente se ven los efectos letales reduciendo sus poblaciones.	El fluazurón es su exponente, se caracteriza por interferir principalmente en la formación de la quitina, impidiendo la formación de la cutícula de la garrapata.

3.2.1.3 Control inmunológico

Como una alternativa para el control de la garrapata, mediante la aplicación de vacunas que no matan ni derriban inmediatamente a las garrapatas adheridas al bovino, su acción se ejerce sobre las siguientes generaciones y paulatinamente va disminuyendo la carga parasitaria en los potreros por una reducción en el potencial reproductivo de la garrapata. No elimina por completo el uso de ixodicidas, sólo lo disminuye por la reducción en el número de baños ^{VII. 20}.



3.2.1.4 Control cultural

Este se lleva a cabo fuera del hospedero y está relacionada con el mantenimiento de potreros que implican actividades que permiten manipular o modificar el hábitat con la finalidad de afectar de manera adversa el desarrollo de la garrapata tales como: quema controlada, inundación, remoción de maleza y subsuelo, descanso y rotación de potreros ^{VII. 19}.

3.2.1.5 Métodos de aplicación de ixodicidas para el control de las garrapatas

El método más utilizado para el control de la garrapata es mediante el uso de productos químicos siendo los ixodicidas los más utilizados para el control de las garrapatas en México a continuación se describen las formas de aplicación más comunes en la ganadería.

Baños de inmersión: es el paso de los animales por las disoluciones, suspensiones o emulsiones de garrapaticidas (**Figura 6. A**) ^{VII. 2}.

Tratamiento por derrame dorsal: existen dos tipos: "pour-on" o epicutáneo (**Figura 6.B**) este método consiste en derramar el producto sobre la línea media dorsal del bovino, desde la cruz hasta la base de la cola y "spot-on" (transcutáneo) es cuando el producto se coloca en un solo sitio del dorso del animal ^{VII. 43}. Las formulaciones actúan sobre los parásitos por contacto y por medio de los vapores que emanan, formando una atmósfera que rodea el cuerpo del animal tratado.

Aspersión manual: es el método de mojado más simple y se utiliza cuando hay que bañar unos pocos animales (**Figura 6.C**).



Figura 6. Formas de aplicación de ixodicidas en el ganado bovino

Tratamiento parenteral: es la aplicación de productos mediante inyecciones, el método es comúnmente utilizado para la aplicación de endectocidas.

Tratamiento con aretes y collares impregnados: dispositivos elaborados a base de plástico o PVC, a partir del sitio de aplicación alcanzan todo el cuerpo del animal.



3.3 Amitraz

El Amitraz pertenece a la familia de las amidinas, la fórmula se muestra en la **Figura 7**:

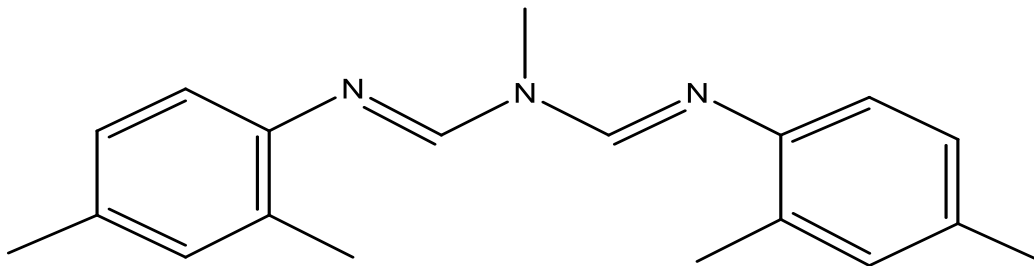


Figura 7. Fórmula química desarrollada del Amitraz.

3.3.1 Propiedades Físicas y Químicas

- Apariencia: polvo cristalino de color blanco o amarillo.
- Fórmula molecular: $C_{19}H_{23}N_3$.
- Peso molecular: 293.4 g/mol.
- Punto de fusión: 87-88 °C.
- Acidez y alcalinidad: base débil.
- Solubilidad: en disolventes orgánicos.
- Solubilidad en agua menor a 1ppm.
- Presión de vapor (20°C): 3.8×10^{-7} mmHg.
- Vida media en agua a pH 7 y 20°C mayor a 12 semanas.
- DL_{50} en mg/Kg: oral 600 ppm. Dérmico mayor a 1600 ppm ^{VII. 20}.

Base débil que no produce sales, se hidroliza en medio ácido formando un ácido estable, 2,4-dimetilformamidina que puede ser a su vez hidrolizado a 2,4-dimetilanilina ^{VII. 21}.

Estabilidad en suspensión a pH 12 y 20°C, se descompone un 20 % en 12 semanas. Por el contrario, a pH 2 a 20°C es inestable, en un día se degrada el 86 %. Es relativamente estable al calor.



Las amidinas son antagonistas de los receptores de la octopamina en el cerebro de los parásitos que provocan hiperexcitabilidad, seguidamente parálisis y finalmente la muerte. La excitación hace también que las garrapatas no logren fijarse al hospedador para chupar sangre. También poseen un cierto efecto repelente lo que hace que muchas garrapatas se desprendan del hospedador antes de morir ^{VII. 22}.

El Amitraz es rápidamente metabolizado por varias especies, incluyendo los humanos, para formar metabolitos que se excretan principalmente en la orina. La EPA ha establecido una dosis de referencia para el Amitraz a 25 mg/kg/día basado en los resultados del estudio de toxicidad oral crónica en los perros ^{VII. 23}.

Tiene una alta efectividad y una baja toxicidad para los animales, aún los gestantes, fauna silvestre y en el hombre. Ecológicamente amigable, se degrada en el suelo en aproximadamente 24 horas. No tiene periodo de retiro para la leche y la carne de los animales tratados.

Es eficaz contra las garrapatas, incluyendo a las resistentes a los plaguicidas organofosforados y piretroides. También actúa contra los piojos, las pulgas y los ácaros causantes de la sarna en los animales domésticos.

Desde el primer día ejerce su acción en un 95 % y para el segundo día después del baño los animales se encuentran limpios de las garrapatas.

El Amitraz fue patentado en 1971, registrado como plaguicida de grado técnico en 1975, y comercializado en 1981. La EPA lo clasifica como clase III, nocivo ^{VII. 23}.

Es efectivo contra los huevos y las larvas de algunos lepidópteros y contra insectos como chinches, pulgones y chupadores entre otros.



Las diversas formulaciones del Amitraz patentadas, presentan el mismo contenido del principio activo (12.5 % Amitraz), para las muestras simuladas en este trabajo se utilizó el producto comercial "Taktic" con la siguiente patente:

(10) AR051322 A1 (Identificación del documento) ^{VII. 24}

(21) P05010423 (Número de solicitud)

(22) 07/10/05 (Fecha de presentación)

(30) US 60/616995 08/10/04 (Datos de prioridad)

US 60/683646 23/05/05

(51) A01N 37/52, 37/18, 43/08 (Clasificación Internacional de Patentes 7ª Edición)

(54) COMPOSICIONES DE AMITRAZ (Título de la invención)

(57) La presente proporciona una composición estable que comprende una mezcla de disolventes que contienen grupos no hidroxilados que comprende N,N-dietil-m-**toluamida** y γ -hexalactona, opcionalmente con dimetilsulfóxido, eucaliptol y acetato de 1-metoxi-2-propilo; y una cantidad efectiva de Amitraz y de al menos un compuesto parasiticida adicional, como por ejemplo R-28153. Esta composición permite elevadas concentraciones de una mezcla de agentes parasiticidas en una sola aplicación y es útil para tratar y controlar infecciones e infestaciones parasiticidas en un animal homeotérmico.

(71) WYETH (Solicitante)

FIVE GIRALDA FARMS, MADISON, NUEVA JERSEY 07940-0874, US

(74) 195 (Número matrícula de agente)

(41) Fecha: 03/01/2007 (Depósito Microorganismos)



3.4 Espectrofotometría

3.4.1 Principios Básicos

La espectrofotometría se refiere al uso de la luz para medir las concentraciones de sustancias químicas ^{VII. 26}.

Los rayos gama, los rayos X, la luz ultravioleta, la luz visible, la radiación infrarroja, las microondas y las ondas de radio forman parte del espectro electromagnético. La radiación electromagnética se comporta como una onda que viaja a la velocidad de la luz, por lo cual esta radiación puede describirse en términos de su longitud de onda y su frecuencia.

La longitud de onda es la distancia entre dos puntos idénticos y consecutivos de una onda, se representa por el símbolo λ (lambda griega) y suele expresarse en metros como unidad fundamental SI.

La frecuencia, el número de ciclos completos de onda que pasan por un punto dado por segundo, se representa por el símbolo ν (nu griega) y se reporta en hertz (Hz), donde $1 \text{ MHz} = 10^6 \text{ Hz}$. La longitud y la frecuencia son inversamente proporcionales, y se pueden calcular una con otra mediante la siguiente relación **Ecuación 1**:

$$\nu\lambda = c \qquad \text{Ecuación 1}$$

Otra manera de describir la radiación electromagnética es en términos de sus propiedades como corriente de partículas, llamadas fotones. La energía de un mol de fotones se relaciona con la frecuencia de la radiación mediante la **Ecuación 2**:



$$E = h\nu = h\left(\frac{c}{\lambda}\right) \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde h es la constante de Planck, $9.54 \times 10^{-14} \text{ kcal}\cdot\text{s}\cdot\text{mol}^{-1}$. En la **Ecuación 2** indica que las radiaciones de alta energía corresponden a las longitudes de ondas cortas y viceversa. De este modo, la luz ultravioleta (de energía más alta) tiene una longitud de onda más corta (aproximadamente 10^{-7}).

La espectrofotometría permite determinar el contenido elemental y molecular de los materiales. Sin embargo, es importante observar que en cada región del espectro electromagnético tiene sus propios beneficios, inconvenientes, especificidades e interferencias que se clasifican en tres tipos ^{VII. 26}:

1. Interferencia espectral: cuando la absorción o emisión de otros componentes de la matriz se verifica a la misma longitud de onda (o longitudes de onda) empleadas para el ensayo ^{VII. 27}.
2. Interferencia química: cuando el material que se está determinando no tiene la misma forma química en el intervalo de concentración determinable, o cuando dicha forma varía significativamente al modificarse la matriz. De esta manera, parte de la potencia espectral esperada probablemente no se presente a las longitudes de onda elegidas para el análisis ^{VII. 23}.
3. Interferencia instrumental: producida porque llega un exceso de iluminación al transductor debido a imperfecciones del instrumento ^{VII. 26}.

Los instrumentos para medir la absorción de radiación UV o Visible constan de los siguientes componentes ^{VII. 27} (**Figura 8**):



1. Fuentes: para la región ultravioleta se ocupan lámparas de deuterio e hidrógeno que cubren un intervalo de λ de 160 a 375nm. Para la región del Visible se utilizan lámparas de filamento de tungsteno, cuyo intervalo de λ va de 350 a 2500 nm.
2. Selector de longitud de onda (monocromador).
3. Celda para la muestra (que pueden ser de cuarzo, vidrio o plástico).
4. Detector.
5. Procesador de señal y presentación de lectura (graficador).

El intervalo de radiación UV va de 200 a 400nm o $50,000\text{--}25,000\text{ cm}^{-1}$ y el del visible de 400 a 800 nm o $25,000\text{--}12,500\text{ cm}^{-1}$ VII. 28.

La respuesta sigue la ley de Lambert-Beer en un intervalo de concentración caracterizado por la curva de calibración: la fracción de luz incidente que es absorbida por una disolución es proporcional a la concentración del soluto y al espesor de la sustancia atravesada por la luz. La relación entre la luz incidente (I_0) y la reflejada (I) dará una idea de la cantidad de radiación que ha sido absorbida por la muestra. Es lo que se denomina Absorbancia (Abs) o Densidad Óptica (DO).

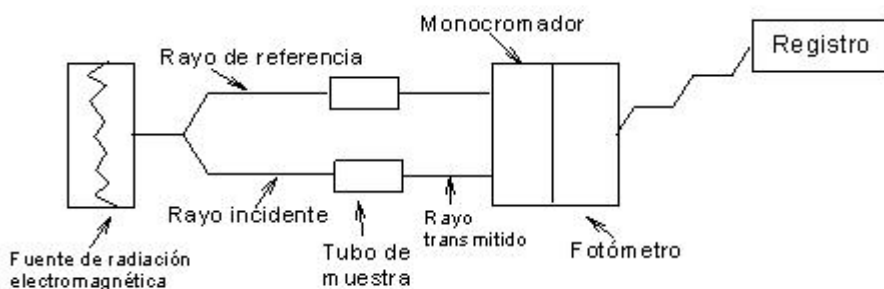


Figura 8. Esquema de un espectrofotómetro



La Ley de Lambert-Beer se formula como:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C \quad \text{Ecuación 3}$$

Siendo ε el coeficiente de extinción molar específico para cada sustancia a una λ y en condiciones determinadas ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), C la concentración de la muestra a determinar (M), y l el espesor del paso óptico de la celda (cm). La mayoría de los espectrofotómetros utilizan celdas para la muestra de un paso óptico 1 cm . Así, la concentración desconocida de la sustancia en estudio se calcula con la $C = A / \varepsilon \cdot l$ Ecuación 4.

$$C = A / \varepsilon \cdot l \quad \text{Ecuación 4}$$

3.4.2 Colorimetría

Cuando en una reacción el color formado es proporcional a la cantidad de la sustancia, a esta se le llama reacción colorimétrica ^{VII. 29}.

Midiendo la intensidad del color se puede conocer la concentración de la sustancia que lo produce. Usamos el término para designar un instrumento para las mediciones de absorción ^{VII. 29} (en la que el ojo humano sirve como detector) utilizando uno o más estándares para la comparación de color. Un fotómetro consiste en una fuente, un filtro, y un transductor fotoeléctrico así como un procesador de señales y lectura. Algunos científicos y fabricantes de instrumentos se refieren a fotómetros como colorímetros o colorímetros fotoeléctricos.



3.5 Cromatografía

En 1906 el científico ruso Tswett efectuó la separación de distintos constituyentes coloridos de las hojas de las plantas, haciendo pasar un extracto de las mismas a través de una columna de carbonato de calcio. Empleó por primera vez el término cromatografía, que proviene de las **palabras griegas que significan "color" y "escritura"**. Este término se emplea para referirse a una separación de componentes de una muestra por distribución entre dos fases, una estacionaria y otra móvil. Indudablemente es la técnica más valiosa en la separación y análisis de mezclas de gran complejidad ^{VII. 30}.

La cromatografía es una técnica de separación que se utiliza hoy día en múltiples tipos de problemas y áreas de la actividad humana. La clasificación de la cromatografía se presenta en la **Figura 9**.

Las técnicas cromatográficas se clasifican en: CGS Cromatografía gas-sólido, CGL Cromatografía Gas-Líquido, CLL Cromatografía Líquido-Líquido, CFQU Cromatografía de Fase Químicamente Unida, 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, y CP Cromatografía en papel.

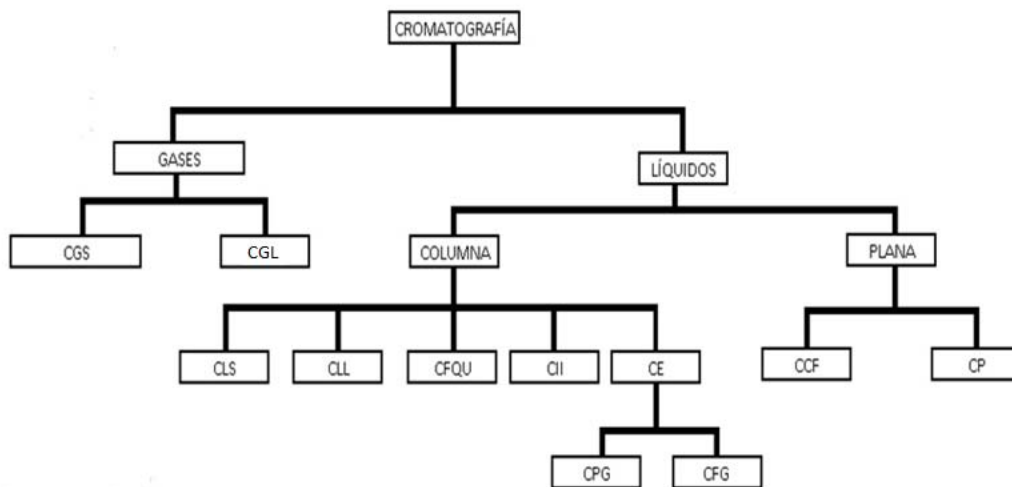


Figura 9. Clasificación general de la cromatografía

3.5.1 Cromatografía de Gases

La cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés) fue iniciada en 1952 por James y Martin. En esta técnica la fase estacionaria es un líquido o sólido fijo dentro de una columna. La fase móvil, es un gas inerte que percola sobre la fase estacionaria y se denomina comúnmente como gas portador. El analito se hace pasar en forma gaseosa.

3.5.1.1 Los componentes fundamentales de un cromatógrafo de gases

- Fase móvil.
- Puerto de inyección.
- Horno y columnas.
- Fase estacionaria.
- Detector.
- Sistema de registro.



Estos componentes están representados en la **Figura 10**.

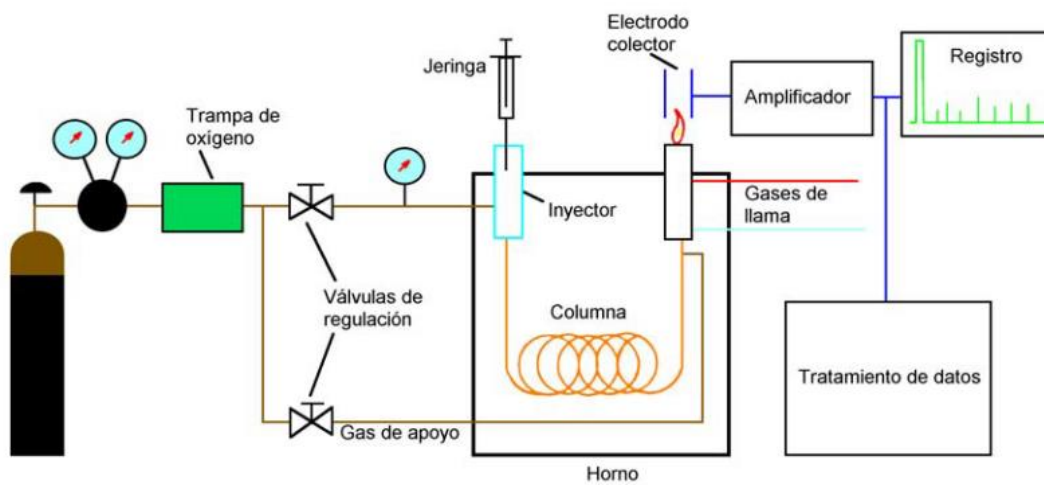


Figura 10. Esquema de un cromatógrafo de gases

3.5.1.2 Requisitos y características de los componentes del cromatógrafo de gases

Fase móvil

Por lo general son gases inertes (Hidrógeno, Helio, Argón o Nitrógeno) que sirven como los portadores de analitos. Los requisitos que deben tener la fase móvil son: baja viscosidad (bajo PM), alta pureza y económico. Los gases más usados son: el Hidrógeno (máxima eficiencia con columnas capilares) y el Helio (sistemas acoplados).

Puerto de inyección

Es un dispositivo que permite la introducción de la muestra en la corriente del gas portador. El inyector se trata de una cámara situada a la entrada de la columna y calentada independientemente de ésta (generalmente a una temperatura superior del punto de ebullición del componente más volátil de la muestra) ^{VII. 31}



La muestra es introducida mediante una microjeringa a través de un sello de silicón (septum).

Hornos y columnas

Las columnas capilares se clasifican en función de la fase estacionaria que contienen. Hay dos tipos de columnas:

- a) WCOT (CGL) que son las más utilizadas, estas son las que comercialmente se conocen con el nombre genérico de columna capilar, casi nunca se utilizan las siglas originales. La fase estacionaria de estas columnas es un líquido.
- b) PLOT (CGS) que se utilizan únicamente en el análisis de gases permanentes y gases de combustión, la fase estacionaria es un sólido.

La columna cromatográfica se coloca en un horno cuya temperatura puede regularse. Al aumentar la temperatura de la columna se reduce el volumen de retención de los solutos y modifica la selectividad de la columna para distintos solutos. El aumento en la temperatura también disminuye la viscosidad del disolvente, de modo que se requiere menos presión para obtener un gasto dado, o se obtiene mayor gasto a una presión dada. La eficiencia de la columna aumenta (menor altura de plato) a alta temperatura porque se eleva la rapidez de difusión en ambas fases, lo cual da una mayor rapidez de equilibrio entre fases.

Detectores

Los detectores son dispositivos que indican y miden los solutos en la corriente del gas acarreador en función de una propiedad física. Generan una señal resultado de la comparación entre el gas acarreador puro



(blanco) y el mismo gas llevando cada uno de los componentes previamente separados en la columna, la señal eléctrica es amplificada y registrada al momento de salir de la columna ^{VII. 31}.

Un buen detector es altamente sensible (sensibilidad), tiene una respuesta lineal (linearidad) sobre un amplio intervalo de concentraciones y es relativamente insensible a variaciones de flujo y temperatura (rango dinámico lineal)^{VII. 31}.

Pueden ser clasificados por:

- Grado de selectividad: universales que responden a la mayoría de los solutos; específicos-selectivos con respuesta a un grupo particular de sustancias.
- Recuperación de la muestra: en referencia a si la muestra es destruida o no.
- Modo de respuesta: dependientes de flujo de masa (cantidad de soluto independientemente de la cantidad de gas portador); dependientes de concentración (cantidad de soluto por unidad de volumen de gas portador).
- Proceso de detección: ionización; óptico-espectroscópico; electroquímico.

Registro y proceso

Se utiliza una tarjeta A/D de alta velocidad y resolución y una computadora personal con el software adecuado.



3.6 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) es un sistema de detección útil en técnicas de separación tales como Cromatografía de Gases (GC, por sus siglas en inglés), Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés), Electroforesis Capilar (CE, por sus siglas en inglés) y otras, debido a que es altamente sensible y es capaz de identificar compuestos químicos en forma precisa, debido a que proporciona el peso molecular, así como información valiosa de la fórmula molecular, empleando una cantidad muy pequeña de muestra (1 *pg* o menos). El reto al acoplar el espectrómetro de masas a un sistema de separación es el mantener el vacío necesario al introducir la muestra desde el cromatógrafo. El bajo gasto de las columnas capilares (1 mL/min) permite acoplar el cromatógrafo de gases y el espectrómetro de masas con relativa facilidad ^{VII. 32}.

Es una técnica instrumental que produce, separa y detecta iones en fase gaseosa (**Figura 11**).

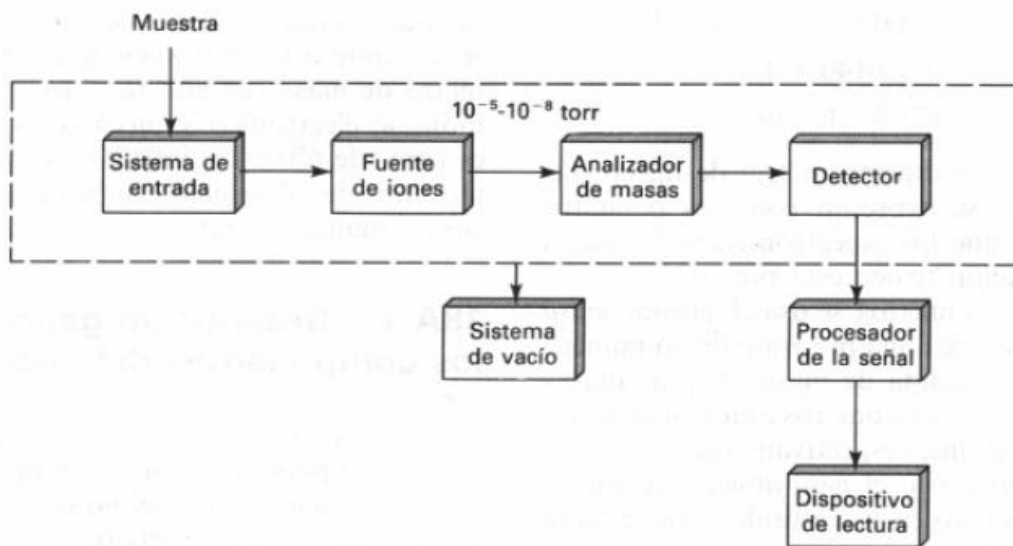


Figura 11. Componentes de un espectrómetro de masas

3.6.1 Fundamentos teóricos prácticos de la Espectrometría de Masas

La Espectrometría de masas se fundamenta en la separación de partículas moleculares o atómicas por su diferente relación masa/carga (m/z o m/e).

El proceso de esta comprende básicamente cuatro etapas ^{VII. 33}.

- Ionización de la muestra.
- Aceleración de los iones por un campo eléctrico.
- Dispersión de los iones según su masa/carga.
- Detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica.

La **Figura 12** muestra un cuadrupolo conectado a un cromatógrafo que registra el espectro de masas de los picos a medida que se eluyen. Los eluatos pasan a través de un conector caliente a la cámara de ionización



electrónica del espectrómetro, conectada a una bomba que la mantiene a un vacío elevado. Los iones son acelerados a un potencial de 5-15 V antes de entrar en el separador de masas.

El separador consiste en cuatro barras metálicas paralelas a las que se aplica un voltaje constante y oscilante de radiofrecuencia. El campo eléctrico desvía los iones, haciéndoles seguir trayectorias diversas a medida que van de la cámara de ionización hacia el detector, y permitiendo que solo lleguen al detector los que tienen una relación (m/z) determinada. Los demás iones (no resonantes) chocan con los cilindros, y se pierden antes de llegar al detector. Variando rápidamente los voltajes aplicados, se seleccionan los iones de varias masas que llegan al detector ^{VII. 33}.

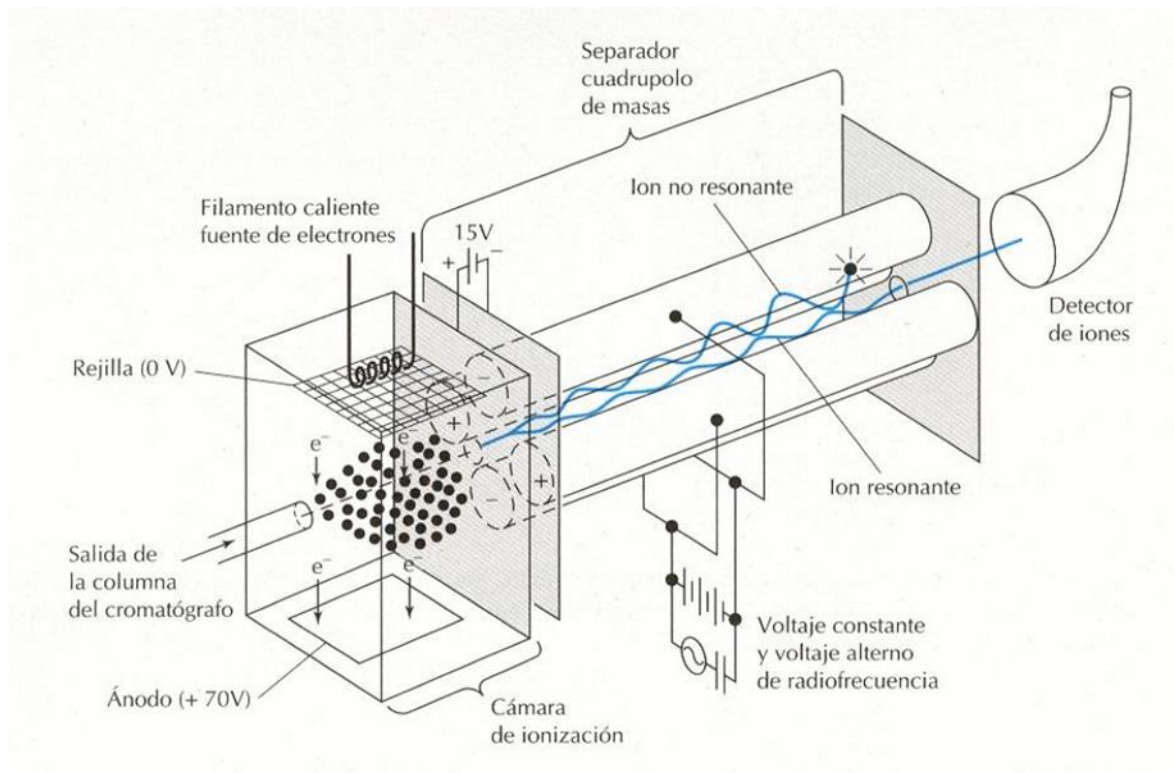


Figura 12. Cuadrupolo de un espectrómetro de masas



En el espectrómetro de masas, llegan electrones de alta energía a la muestra, rompiendo las moléculas. Se miden las masas de los fragmentos, y se usa esta información para reconstruir la molécula.

Un espectrómetro de masas ioniza las moléculas a un alto vacío del orden de 10^{-7} torr, clasifica a los iones de acuerdo a sus masas, y registra la abundancia de los iones de cada una de las masas ^{VII. 34}.

Una muestra con una presión de vapor moderadamente alta se introduce en un sistema de admisión, que trabaja a un vacío de 10^{-4} a 10^{-7} torr y a alta temperatura, hasta 300°C . La muestra se evapora y se arrastra hacia la fuente de ionización. Los compuestos no volátiles se pueden evaporar mediante una chispa u otra fuente. Las moléculas del analito suelen ser neutras y se deben ionizar.

En la espectrometría de masas es importante la separación de los iones fragmento: es decir la capacidad para diferenciar dos masas, se determina con la resolución, definida como la masa nominal dividida entre la diferencia de dos masas que se pueden separar.

$$R = m/\Delta m \quad \text{Ecuación 5}$$

Dónde: Δm = diferencia de masas entre dos máximos resueltos

m = masa nominal donde se encuentra el máximo.

En la **Tabla III** se muestran los mecanismos de ionización más utilizados en Espectrometría de masas y sus principales características.



Tabla III. Formas de ionización en espectrometría de masas

Método de ionización	Analitos	Introducción de la muestra	Intervalo de masa (Da)	Características
Ionización electrónica (EI)	Relativamente pequeños (volátiles).	GC o sonda líquido sólido	< 1000	Método vigoroso, versátil, proporciona información sobre la estructura.
Ionización química (CI)	Relativamente pequeños (volátiles).	GC o sonda líquido-sólido	< 1000	Método suave, Pico de ion molecular $[M + H]^+$
Electropulverizador (electrospray, ESI)	Péptidos, proteínas (no volátiles).	Cromatografía de líquidos o infusión directa	< 200,000	Método suave. Con frecuencia los iones tienen cargas múltiples
Desorción de la matriz asistida por láser (MALDI)	Péptidos, proteínas, nucleótidos	Muestra mezclada en matriz sólida	< 500,000	Método suave, masas muy altas.

En todos los casos, alguna forma de energía es transferida a las moléculas a analizar para afectar la ionización. En la técnica clásica de ionización electrónica (EI, por sus siglas en inglés), algunas de las **moléculas ionizadas del analito "explotan" en una variedad de fragmentos ionizados**, el patrón de fragmentación resultante así como los iones residuales constituyen el espectro de masas. En principio, el espectro de masas de cada compuesto es único y puede ser usado como su **"huella química" para caracterizar el analito.**

Con la espectrometría de masas somos capaces de proporcionar información acerca de:

- La composición elemental de las muestras ^{VII. 35}.
- La composición de las moléculas inorgánicas, orgánicas y biológicas.
- La composición cualitativa y cuantitativa de mezclas complejas ^{VII. 36}.



- La estructura y composición de superficies sólidas.
- Las relaciones isotópicas de átomos en las muestras.

Estos métodos poseen muchas aplicaciones como son el desarrollo de productos farmacéuticos, control de sustancias nutritivas y diagnósticos de enfermedades ^{VII. 37} como la malaria, cáncer de mama, cáncer de próstata, etc.



3.7 Validación

3.7.1 Definición

La validación de un método es el proceso de verificación de que un método es adecuado a su propósito, o sea, para resolver un problema analítico particular. Esta definición es aplicable cuando el método se está desarrollando con un propósito específico ^{VII. 38}.

3.7.2 Utilidad

Cuando se realiza la validación de un método por parte del laboratorio, lo que se busca es poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos.

En la **Figura 13** se muestran los posibles pasos a tratar para la validación de un método. En el que se pueden emplear un método que tradicionalmente por el laboratorio no esté normalizado, entonces se realiza una Validación Retrospectiva, es decir, en base a los datos experimentales que el laboratorio dispone, para la cual se realizará la recopilación de la mayor cantidad de datos históricos disponibles, para luego realizar un proceso de ordenamiento y selección de los datos recopilados, estos datos pueden ser: curvas de calibración, resultados de ensayos, cartas de control, ensayos de aptitud, etc. A través de estos, se deberán determinar los parámetros de validación, y evaluar si los resultados obtenidos para tales fines son aceptables.

En caso de ser un método nuevo (o uno antiguo del que no se dispongan de datos suficientes) se debe realizar una **Validación Prospectiva**, generando a través de análisis datos experimentales.



En algunos casos se puede realizar lo que se conoce como **validación menor o verificación** cuando se trate de:

1. Métodos normalizados.
2. Métodos normalizados usados fuera de su alcance propuesto.
Ejemplo: uso en otra matriz.

Ampliaciones y modificaciones menores de métodos normalizados.
Ejemplo: uso en otros analitos.

3. Cuando se trate de métodos previamente validados, que hayan sufrido alguna alteración significativa por lo cual deben volver a evaluarse. Estas variaciones pueden ser; cambio de equipo, cambio de componentes de equipo como columnas, detectores, cambio analista, cambio de la matriz que contiene la muestra o de nivel de concentración del analito de interés, entre otros.

La verificación, tiene generalmente como objetivo, el comprobar que el laboratorio domina el método de ensayo normalizado y lo utiliza correctamente, en caso de tratarse de un método normalizado modificado para la verificación se requiere solo realizar aquellas pruebas que indiquen que la variación realizada no afecta el ensayo.

En ocasiones, lo que se busca a través de una validación es demostrar que un método es equivalente a otro.

El objetivo de la validación y la verificación, es demostrar que el método utilizado por un laboratorio es adecuado para la aplicación en la que se propone utilizar, así, como también demostrar que las modificaciones que pudieron haberse realizado no afectan su desempeño, ni la confiabilidad de los resultados por este entregado ^{VII.39}.

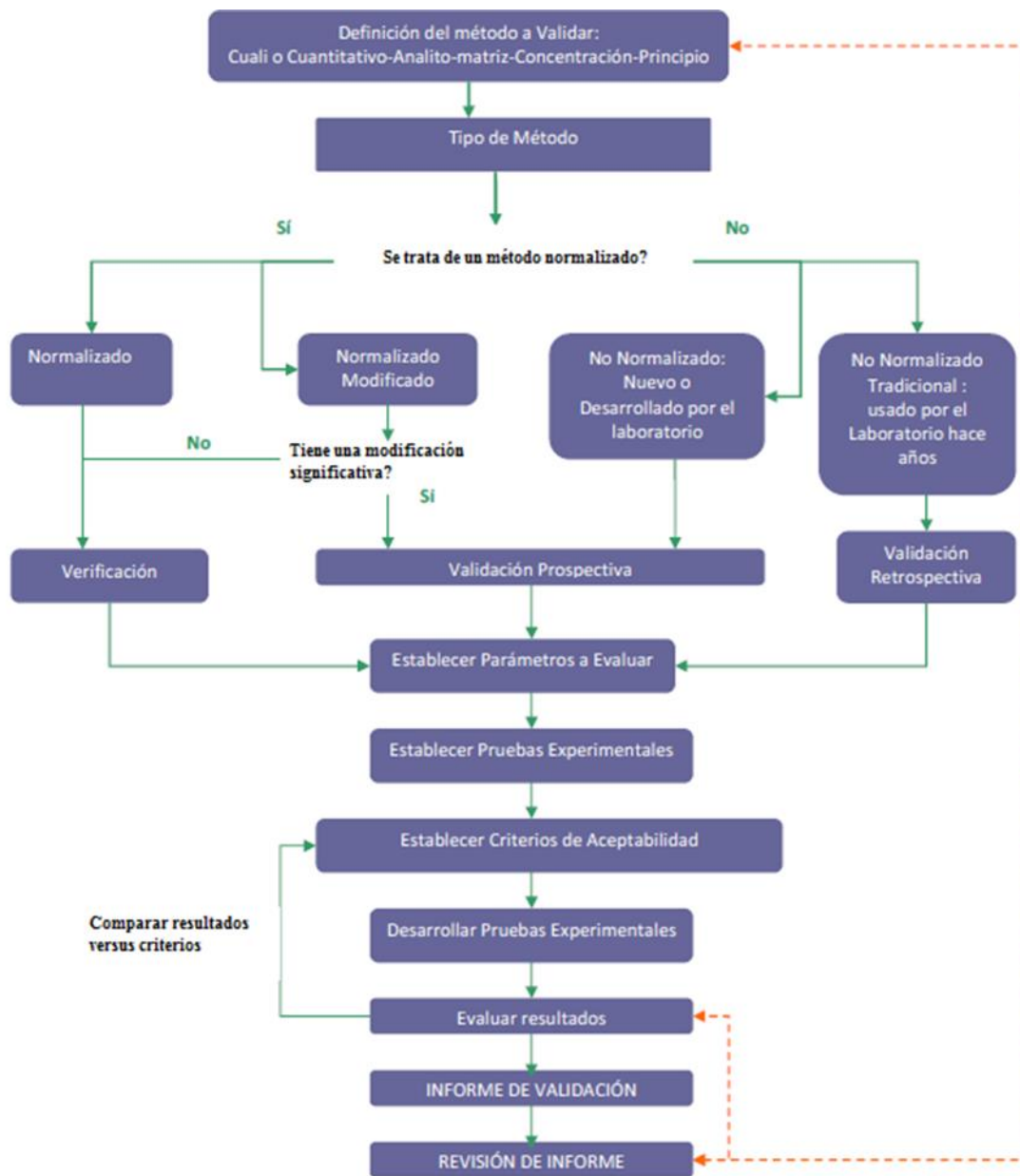


Figura 13. Esquema de validación de un método

3.7.3 Parámetros de desempeño

En relación a los parámetros de validación o verificación estos deberán determinarse de acuerdo al tipo de método. Para este fin la **Tabla IV** puede ser utilizada como guía.

**Tabla IV. Parámetros de desempeño**

Parámetro a evaluar	Características	Método cualitativo	Método cuantitativo		
			Normalizado	Modificado	Nuevo
Selectividad/especificidad	Identificación analito interferencia de matriz.	Sí	No	Sí	Sí
Límites	Crítico (LC) Detección (LD) Cuantificación (LOQ)	Sí	Sí o no	Sí	Sí
Intervalo de trabajo e intervalo lineal	Rango lineal.	No	Sí	Sí	Sí
Veracidad	Sesgo (s) Recuperación (R)	No	Sí o no	Sí o no	Sí
Precisión	Repetibilidad Reproducibilidad	No	Sí	Sí	Sí
Sensibilidad	Pendiente	No	Sí o No	Sí	Sí
Robustez	Test de Youden y Steiner	No	No	Sí o No	Sí
Aplicabilidad	_____	Sí	Sí	Sí	Sí

3.7.3.1 Definiciones de los parámetros de validación

Confirmación de la identidad y la selectividad/especificidad

Es necesario establecer que la señal producida en la etapa de medición o alguna otra propiedad medida, la cual se atribuye al analito, se debe únicamente al analito y no a la presencia de algo química o físicamente similar o que surja como una coincidencia. Esta es la confirmación de la identidad. La interferencia de otros compuestos en la medición del analito, dependerá de la efectividad de la etapa de separación y de la selectividad/especificidad de la etapa de medición.



La selectividad de un método se investiga mediante el estudio de su capacidad para medir el analito de interés en porciones de prueba a las cuales deliberadamente se han introducido interferencias específicas aquéllas que se cree probable estén presentes en las muestras. Si no se está seguro de que las interferencias están presentes, la selectividad de un método se puede investigar estudiando su capacidad de medir el analito comparado con otros métodos o técnicas independientes.

Otro aspecto de la selectividad que debe considerarse es si el analito puede existir en la muestra en más de una forma tal como: ligado o libre; inorgánico u organometálico o en diferentes estados de oxidación.

Límite de Detección

La ISO utiliza como un término general "valor mínimo detectable de la variable de estado definida" el cual en química se traduce como la "concentración neta mínima detectable". La IUPAC es cautelosa en el "valor mínimo detectable de la variable de estado definida" el cual en química se traduce como la "concentración neta mínima detectable". La IUPAC es cautelosa en el uso de "límite de detección" prefiriendo "valor (verdadero) mínimo detectable".

Límite de Cuantificación

El "límite de cuantificación"(LoQ) estrictamente es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión de repetibilidad y veracidad.



Intervalo de trabajo e intervalo lineal

Para cualquier método cuantitativo es necesario determinar el intervalo de concentraciones del analito o los valores de la propiedad relacionada, sobre los cuales el método puede aplicarse. En el extremo inferior del intervalo de concentración, los factores limitantes son los valores del límite de detección y/o cuantificación. En el extremo superior del intervalo de concentración, las limitaciones serán impuestas por varios efectos que dependen del sistema de respuesta del instrumento.

Dentro del intervalo de trabajo puede existir un intervalo de respuesta lineal. Dentro del intervalo lineal la señal de respuesta tendrá una relación lineal con la concentración del analito o del valor de la propiedad relacionada.

Dentro del intervalo lineal, un punto de calibración puede ser suficiente para establecer la pendiente de la curva de calibración pero en el intervalo de trabajo será necesaria la calibración con varios puntos (preferentemente más de 6). La relación entre la respuesta del instrumento con la concentración no tiene que ser perfectamente lineal para que un método sea efectivo pero la curva debe ser repetible día con día. Observe que los intervalos de trabajo y lineal pueden ser diferentes para distintas matrices de acuerdo al efecto de las interferencias que produce la matriz.

Cuando el método utiliza alguna clase de instrumentación puede ser útil considerar la sensibilidad, la discriminación, el umbral de discriminación y el tiempo de respuesta.



Exactitud

La "exactitud" expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero (definición ISO 3534-1). La validación de un método busca cuantificar la exactitud probable de los resultados evaluando tanto los efectos sistemáticos como los aleatorios sobre los resultados. Normalmente la exactitud se estudia en dos componentes: la "**veracidad**" y la "**precisión**".

Veracidad

La evaluación práctica de la veracidad se fundamenta en la comparación de la media de los resultados de un método con relación a valores conocidos, es decir, la veracidad se determina contra un valor de referencia (o sea, un valor verdadero o un valor verdadero convencional).

Se dispone de dos técnicas básicas: la verificación con respecto a los valores de referencia de un material caracterizado o de otro método caracterizado.

Interpretando las mediciones de sesgo

El sesgo del método surge de los errores sistemáticos inherentes al método cualquiera que sea el laboratorio que lo usa. El sesgo del laboratorio surge de errores sistemáticos adicionales característicos del laboratorio y de la interpretación que éste hace del método. En forma aislada, un laboratorio puede estimar solamente el sesgo combinado.

El sesgo total determinado por un laboratorio particular durante la validación debe entonces compararse con cualquier sesgo reportado para el método normalizado.



Sin embargo, para la mayoría de los propósitos, la aceptación del sesgo debe decidirse sobre la base del sesgo total medido contra materiales o métodos de referencia apropiados, tomando en cuenta la precisión del método, la incertidumbre en los valores de los materiales de referencia y la exactitud requerida para el uso pretendido.

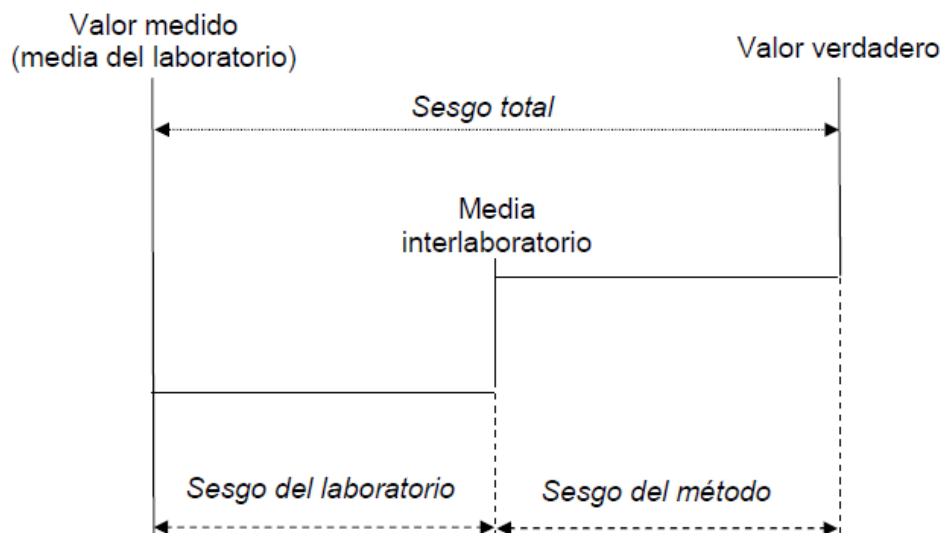


Figura 14. Tipos de sesgo

En la **Figura 14** se presentan los sesgos del laboratorio y del método actuando en la misma dirección. En la realidad, esto no es siempre el caso.

Precisión

Las medidas de precisión más comunes son la "repetibilidad" y la "reproducibilidad".

La precisión se determina por lo general en términos de la desviación estándar o la desviación estándar relativa. Tanto la reproducibilidad



como la repetibilidad dependen generalmente de la concentración del analito y deben determinarse a varias concentraciones y de ser pertinente, deberá establecerse la relación entre la precisión y la concentración del analito. La desviación estándar relativa puede ser más útil en este caso puesto que la desviación estándar dividida por la concentración es prácticamente constante dentro del intervalo de interés, a condición de que éste no sea demasiado grande.

Precisión Intermedia

La precisión intermedia expresa la variación dentro de un laboratorio en: diferentes días, diferentes analistas, diferente equipo, etc.

Repetibilidad

La repetibilidad (la precisión más pequeña esperada) dará una idea de la clase de variabilidad esperada cuando un método se ejecuta por un solo analista, con un equipo en un período corto de tiempo, es decir, es la clase de variabilidad que se espera entre resultados cuando una muestra se analiza por duplicado.

A partir de la desviación estándar de repetibilidad σ_r , o s_r , es útil calcular el límite de repetibilidad "r", el cual permite al analista decidir si es significativa la diferencia entre análisis duplicados de una muestra determinados bajo condiciones de repetibilidad.

Reproducibilidad

Si la muestra se analiza por varios laboratorios para fines comparativos, entonces una medida de precisión más significativa a usarse es la reproducibilidad (ésta es la medida de precisión más grande



normalmente encontrada, a pesar de que formalmente se excluye la variación con respecto del tiempo).

A partir de la desviación estándar de reproducibilidad σ_R , o s_R , es útil calcular el límite de reproducibilidad "R", el cual permite al analista decidir si es significativa la diferencia entre análisis duplicados de una muestra determinados bajo condiciones de reproducibilidad.

Incertidumbre de la Medición

La incertidumbre de medición es un parámetro único (usualmente una desviación estándar o un intervalo de confianza) que expresa el intervalo de posibles valores sobre la base de los resultados de medición. Una estimación de la incertidumbre de medición considera todos los efectos reconocidos que influyen en el resultado; las incertidumbres asociadas a cada efecto son combinadas de acuerdo a procedimientos bien establecidos.

La estimación de la incertidumbre en química analítica debe considerar:

- La precisión total del método en un período largo de tiempo.
- El sesgo y su incertidumbre, incluyendo la incertidumbre estadística asociada a las mediciones del sesgo y la incertidumbre del material de referencia o del método. Puede ser necesario incrementar la estimación cuando se detecte un sesgo importante que no ha sido corregido.
- Incertidumbres de calibración. Siendo que la mayoría de las incertidumbres de calibración de equipos serán despreciablemente pequeñas en comparación con la precisión total y la incertidumbre en el sesgo, esto necesitará solamente ser verificado.



- Debe adicionarse cualquier otro efecto significativo que actúa además de los anteriores y que pudo no haberse aplicado totalmente en un estudio de validación, por ejemplo, la temperatura o los intervalos de tiempo permitidos por el método. Dichos efectos pueden ser cuantificados por estudios de robustez o estudios relacionados que establecen el tamaño de un efecto dado sobre el resultado.

Sensibilidad

Ésta es efectivamente la pendiente de la curva de respuesta, es decir, el cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en la concentración del analito. Cuando se ha establecido que la respuesta es lineal con respecto a la concentración (o sea, dentro del intervalo lineal del método) y se ha determinado la intercepción de la curva de respuesta, la sensibilidad es un parámetro útil para calcular y usar en fórmulas de cuantificación.

Robustez

La robustez por lo general se evalúa durante el desarrollo del método, comúnmente por el laboratorio que lo ha propuesto y antes de la colaboración con otros laboratorios. La AOAC describe una técnica establecida para pruebas de robustez. Las pruebas de robustez se aplican normalmente para investigar su efecto sobre la precisión y la exactitud del método.

Recuperación

Una forma de determinar la eficiencia de extracción es agregar a una matriz porciones de prueba con el analito a varias concentraciones, después se extraen las porciones de prueba fortificadas y se mide la



concentración del analito. Un problema inherente a este proceso es que el analito introducido de este modo no estará tan fuertemente ligado como aquél que se encuentra naturalmente en la porción de prueba de matriz y por consiguiente, la técnica dará una impresión irrealmente alta de la eficiencia de extracción. Sin embargo, ésta es la forma más común de determinar la eficiencia de recuperación y está reconocida como una forma aceptable de hacerlo.



IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Material, reactivos y equipo

4.1.1 Material

- Material de vidrio: vasos de precipitados de 10, 20, 50 y 100 mL, matraces aforados de 10 mL, para garantizar exactitud, fue necesario calibrarlos individualmente (ver en la página 87)
- Celdas de cuarzo de 1cm de paso óptico.
- Viales ámbar de 15 mL y de 120 mL.
- Viales transparente de 2 y 4 mL.
- Jeringas de 10 μ L, (Hamilton, USA).
- Embudos de filtración rápida.
- Micropipeta 100-1000 μ L, (Wheaton Socorex, Suiza).
- Micropipeta de 10-100 μ L, (Wheaton Socorex, Suiza).

4.1.2 Reactivos

- Estándar de Amitraz CAS-No [33089-61-1], pureza 99.4 %. (Sigma-Aldrich, USA)
- Tetrahidrofurano grado HPLC (Sigma-Aldrich, USA)
- Agua desionizada ultrapura (resistencia específica mayor de 12 Mohm/cm).
- Muestra de baño garrapaticida de reciente uso, "Baño Santa Elena".
- Muestra de baño garrapaticida viejo y contaminado, "baño viejo".
- Producto comercial Taktic (N'-(2,4-dimetilfenil)-N-[[[(2,4-dimetilfenil) imino]metil]-N-metilmetanimidamida) o Amitraz equivalente a 125 mg/L no menos de 12.5 %, ingredientes inertes: Emulsificantes y disolventes no más de 87.5 %.
- Helio grado BIP, (INFRA, México).



- Nitrógeno cromatográfico, (INFRA, México).

4.1.3 Equipo

- Espectrofotómetro UV/Vis marca Ocean Optics modelo 2000, fuente de luz DH-2000, con detección por arreglo de diodos.
- Cromatógrafo de gases HP 5890A acoplado a espectrómetro de masas HP5971; fase móvil helio a 1 mL/min, inyector "splitless", columna DB-5 (JW Scientific, USA) 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm de espesor de película.
- Balanza analítica, Ohaus AP250D (250 g de capacidad, resolución: 0,1 mg).
- Vortex, IKA ("labdancer", USA).
- Centrífuga clínica (HETTICH, Modelo EBA III).



4.2 Metodología

4.2.1 Método de laboratorio por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS)

Condiciones cromatográficas: Gradiente de temperatura $T_i=200$ °C, $t_i = 1$ min, $dT/dt= 20$ °C/min, $T_{final} = 300$ °C, $t_{final} = 5$ min. La temperatura del inyector y la línea de transferencia 300 °C. Inyección splitless, tiempo apertura 1 min.

El espectrómetro de masas se trabajó en modos: SCAN (barrido de iones, por sus siglas en inglés) y SIM (monitoreo selectivo de iones, por sus siglas en inglés).

Se validaron los siguientes parámetros: precisión, repetibilidad y reproducibilidad intermedia (intra-laboratorio), incertidumbre combinada de la medición, exactitud como ausencia de errores sistemáticos en todo el intervalo de trabajo (linealidad del sistema), linealidad del método (intervalo lineal y de trabajo), límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ), ausencia de efectos de la matriz, estabilidad de la muestra y robustez.

4.2.2 Método de campo por UV/Vis

Para la lectura en el espectrofotómetro se estudió primero el efecto del disolvente sobre la solubilidad y estabilidad del Amitraz. Se probaron hexano, acetona, metanol, THF y mezclas de los tres últimos disolventes con agua.

Una vez seleccionado el disolvente, se evaluó la validez de este método usando diversos parámetros.



Una segunda alternativa que se exploró fue la formación de un complejo colorido (imina) que diera más especificidad a la determinación. Se probaron diversos medios buscando una reacción cuantitativa y un complejo con un color fácilmente diferenciable.

4.2.3 Linealidad del sistema

La linealidad se evaluó en diversos momentos del desarrollo del método, por lo que fue necesario preparar varias disoluciones madre y disoluciones de calibración a partir de ésta.

La primera disolución madre se preparó pesando 0.02895 g del estándar de Amitraz, se llevaron al aforo (10.060 ± 0.005 mL) con THF, obteniéndose una concentración de 2877.63 $\mu\text{g/mL}$. Esta primera disolución se ocupó en la determinación de la linealidad de las muestras simuladas.

Para una segunda disolución madre se pesaron 0.02117 g de Amitraz, se disolvieron en THF y se llevaron al aforo de 10 mL, de esta se tomó una alícuota de 1 mL y se llevó al aforo de 10 mL. La concentración final de esta disolución secundaria fue de 210.43 $\mu\text{g/mL}$.

Con estas disoluciones madre se prepararon disoluciones de las curvas patrón en concentraciones de 2 a 20 mg/L.

4.2.4 Repetibilidad y estabilidad

Estos parámetros se evaluaron por un periodo de diez días, observando las variaciones de la pendiente en las curvas de calibración, por el método de Espectrofotometría UV/Vis.



4.2.5 Efectos de la matriz en los baños de inmersión simulados

Se preparó el producto comercial de la siguiente manera: se tomaron 100 mL de agua corriente, se llevó a pH 12 con hidróxido de calcio (la ficha técnica ^{VII. 42} especifica que se deben agregar 0.6 g para lograr un pH mayor a 12, en la práctica fue necesaria una mayor cantidad). Una vez preparada la disolución alcalina, se agregan 160 μ L de Taktic (producto comercial con 12.5 % de Amitraz). Se obtiene una emulsión estable con 200 mg/L de Amitraz. Una vez preparada, se estudiaron los efectos de matriz simulando baños en operación, para ello se rotularon 9 vasos, a cada vaso se le agregaron 5 mL de esta emulsión y se les agregó tierra como se especifica en la **Tabla V**. La tierra fue colectada del jardín sin ningún tratamiento previo.

Tabla V. Baños simulados

No. de vaso	Peso (g) de tierra de jardín
1	1.009
2	1.004
3	1.007
4	2.007
5	2.002
6	2.004
7	3.009
8	3.002
9	3.003

4.2.6 Cuantificación de Amitraz en muestras enriquecidas

Para la preparación de las muestras se agregó 1 mL de disolución madre a un matraz aforado de 10 mL y se llevó al aforo con la muestra de baño Santa Elena. Se hizo lo mismo con el baño viejo, se rotularon como A y B respectivamente. Para garantizar la estabilidad de la disolución y descartar alguna otra influencia sobre la efectividad del



Amitraz, se agregaron 100 mL de agua sin cal y 160 μL de Tactic, después se realizó el mismo tratamiento de los baños ya descrito.

Se tomaron 555 μL de las disoluciones anteriores y se aforaron a 10 mL con THF, para obtener una proporción 95:5 THF/H₂O.



V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Método de laboratorio por GC/MS

5.1.1 Estabilidad de la muestra

La Tabla VI presenta los resultados de una misma muestra en días diferentes. El análisis se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en modo SIM.

Tabla VI. Estabilidad del Amitraz en los baños de inmersión para el ganado

Día	Amitraz	% de Recobro
1	Estándar	100
3		89.84
1	Baños de inmersión	100
3		30.96

Como se puede observar en estos resultados el Amitraz en los baños de inmersión es poco estable, al transcurso de los días se vio afectada su concentración y su disminución fue notoria.

5.1.2 Linealidad del sistema

Se trazaron curvas de calibración de 0 a 20 mg/L de Amitraz en mezclas THF:H₂O 95:5 % (v/v) y se tuvo un comportamiento lineal como lo demuestran el **Gráfico 1** y el **Gráfico 2**.

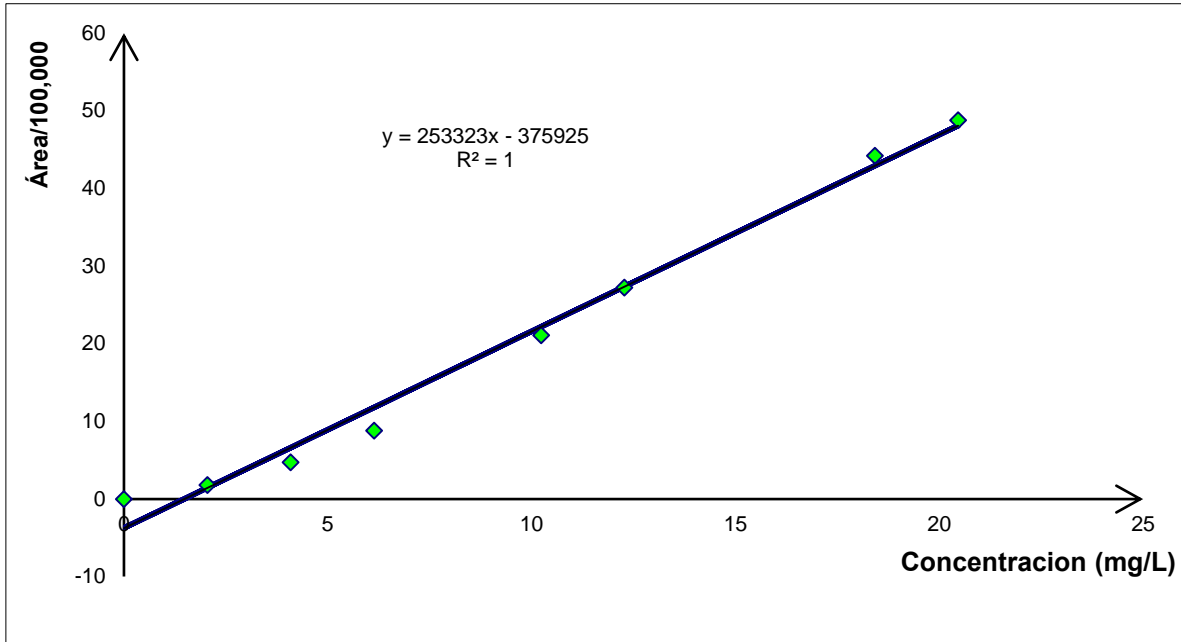


Gráfico 1. Curva de calibración de Amitraz por GC/MS

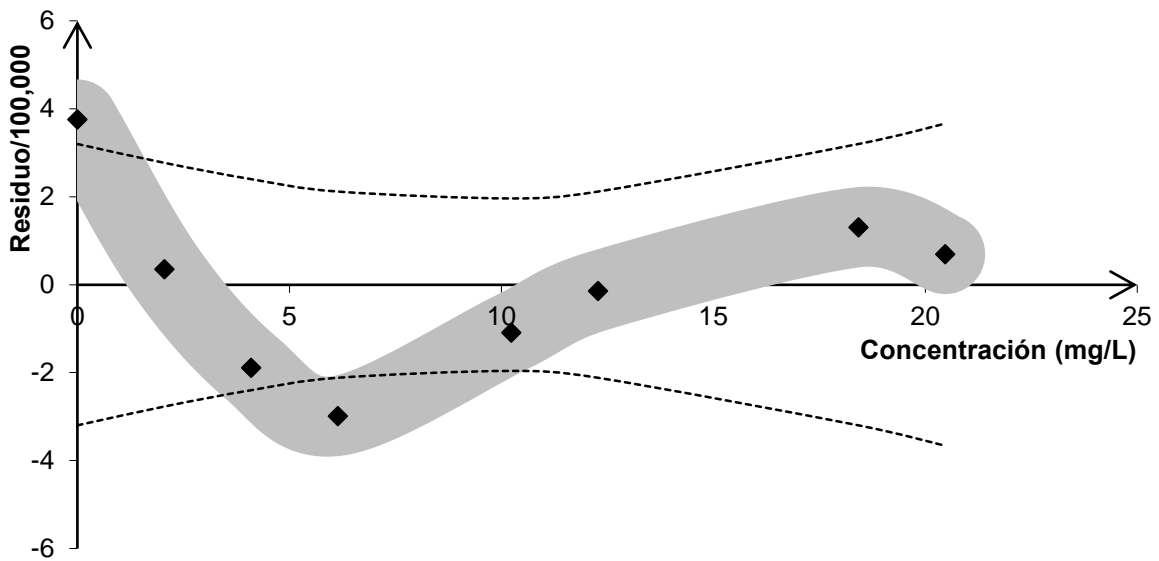
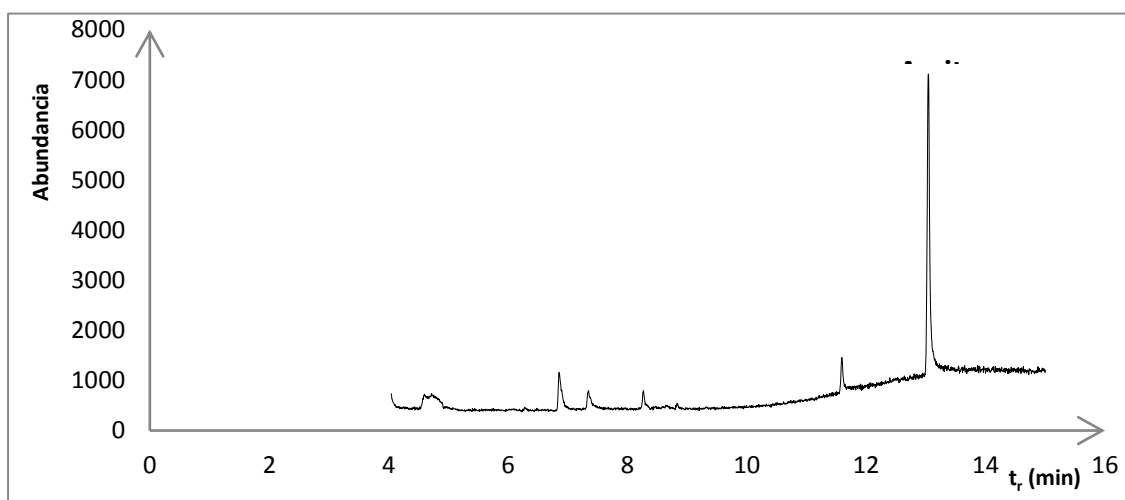


Gráfico 2. Residuos de la curva de calibración



5.1.3 Especificidad

La Cromatografía de gases/Espectrometría de masas en modo de monitoreo selectivo de iones (SIM) es una técnica altamente específica. Para identificar y cuantificar un analito es necesario que eluya en el mismo tiempo de retención, y que además presente los mismos iones fragmento del compuesto en estudio. Dado que se trata de dos técnicas basadas en principios diferentes, la posibilidad de que ocurra una identificación o cuantificación erróneas es muy baja. En este caso, se pudo demostrar al comparar el cromatograma de un estándar de Amitraz (**Cromatograma 1**) que eluye a 13.1 min.

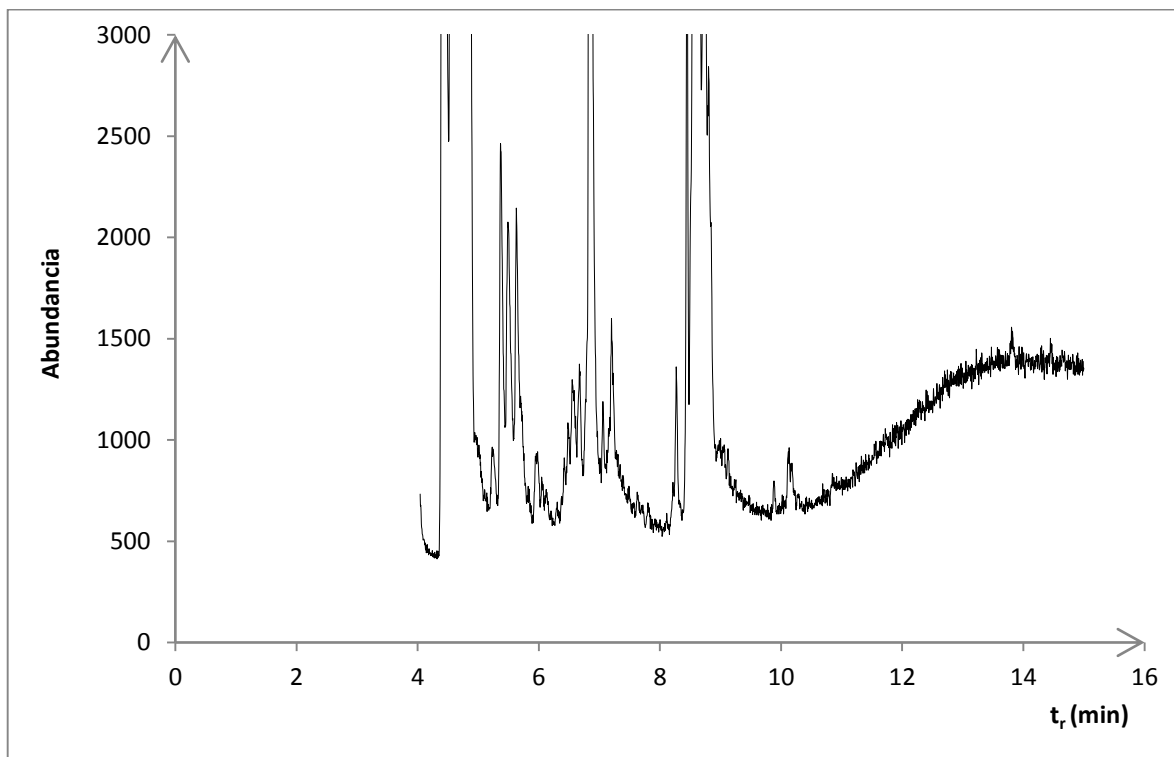


Cromatograma 1. Estándar de Amitraz de concentración de 2mg/mL

Por EM se monitorearon los iones de m/z 121 y 132 (SIM) como los iones de mayor abundancia. Se analizó por GC/EM la disolución de una muestra vieja de un baño agotado, en el que se deben encontrar los productos de degradación del Amitraz, así como los compuestos químicos que pueden entrar al baño como resultado del contacto con el ganado tratado (**Cromatograma 2**). En este cromatograma se observa

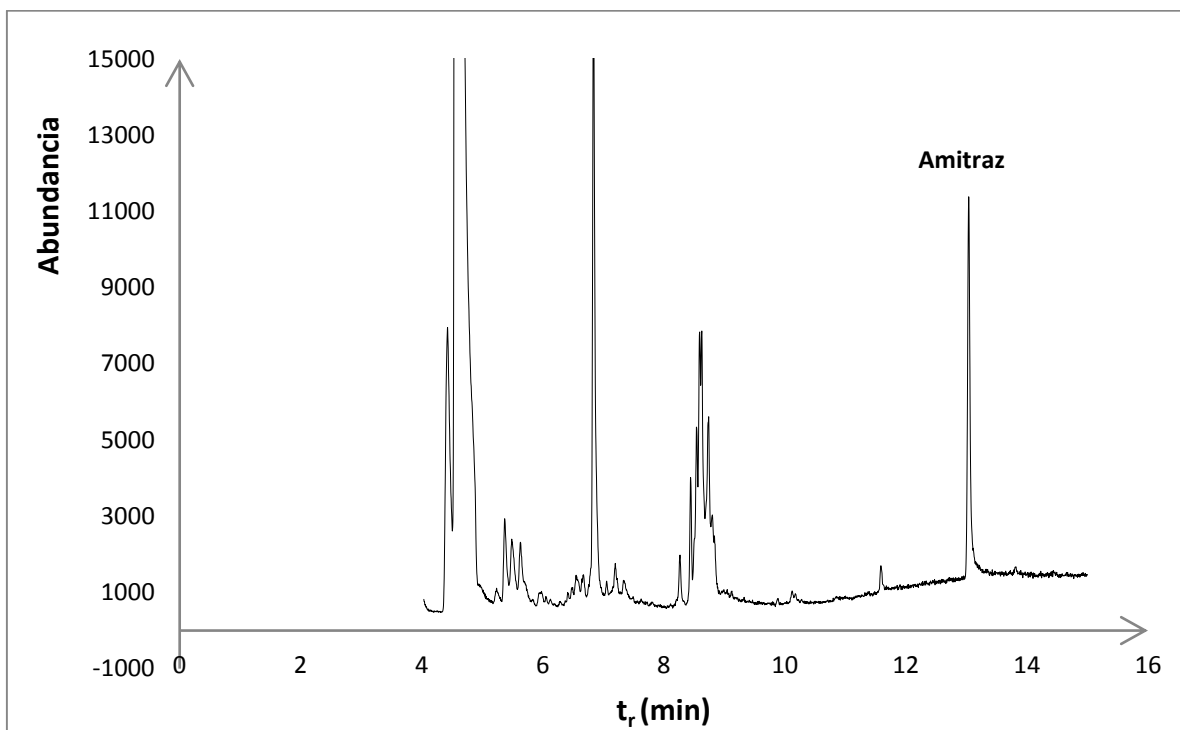


claramente como, si bien aparecen otros picos, no hay ninguna señal alrededor de los 13 min.



Cromatograma 2. Matriz de una muestra agotada

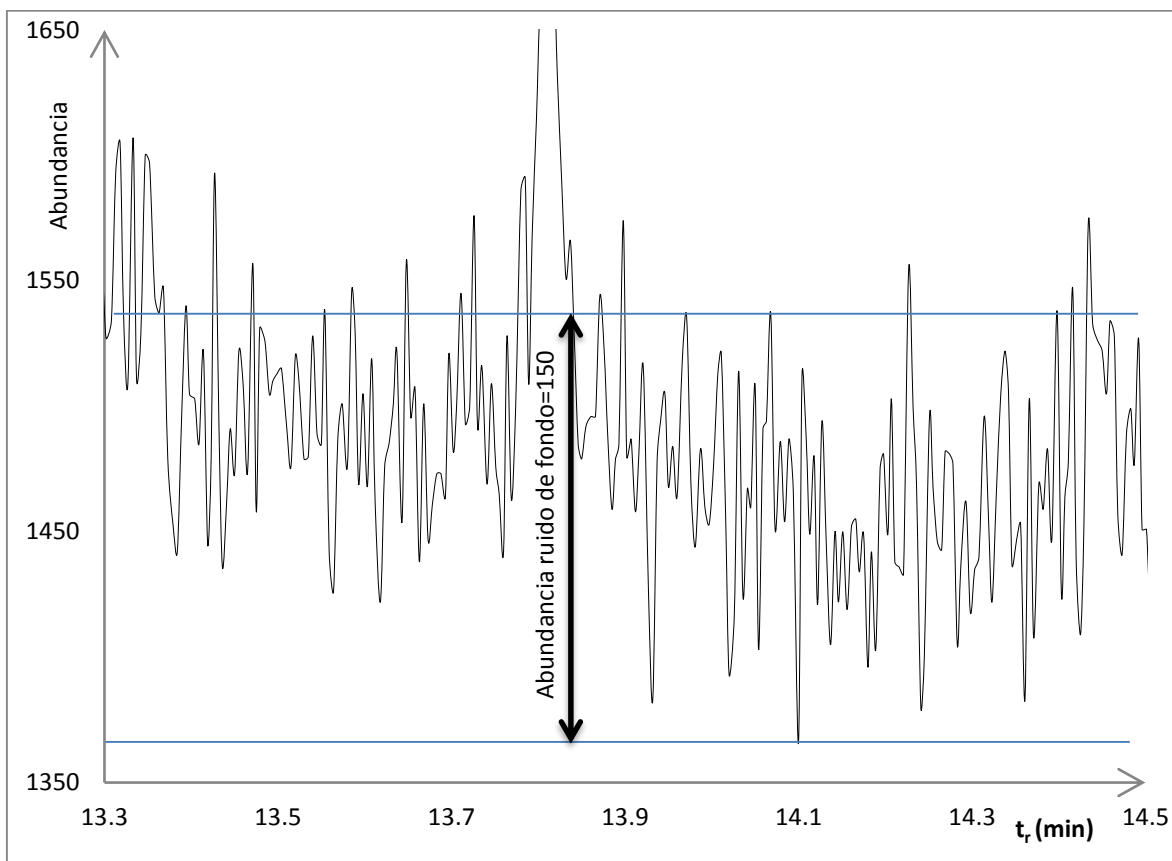
Finalmente, el **Cromatograma 3** corresponde a la misma muestra, enriquecida con 2 mg/L de Amitraz y se observa el pico a los 13.1 min que corresponden al analito de Amitraz.



Cromatograma 3. Matriz enriquecida con 2 mg/mL de estándar de Amitraz

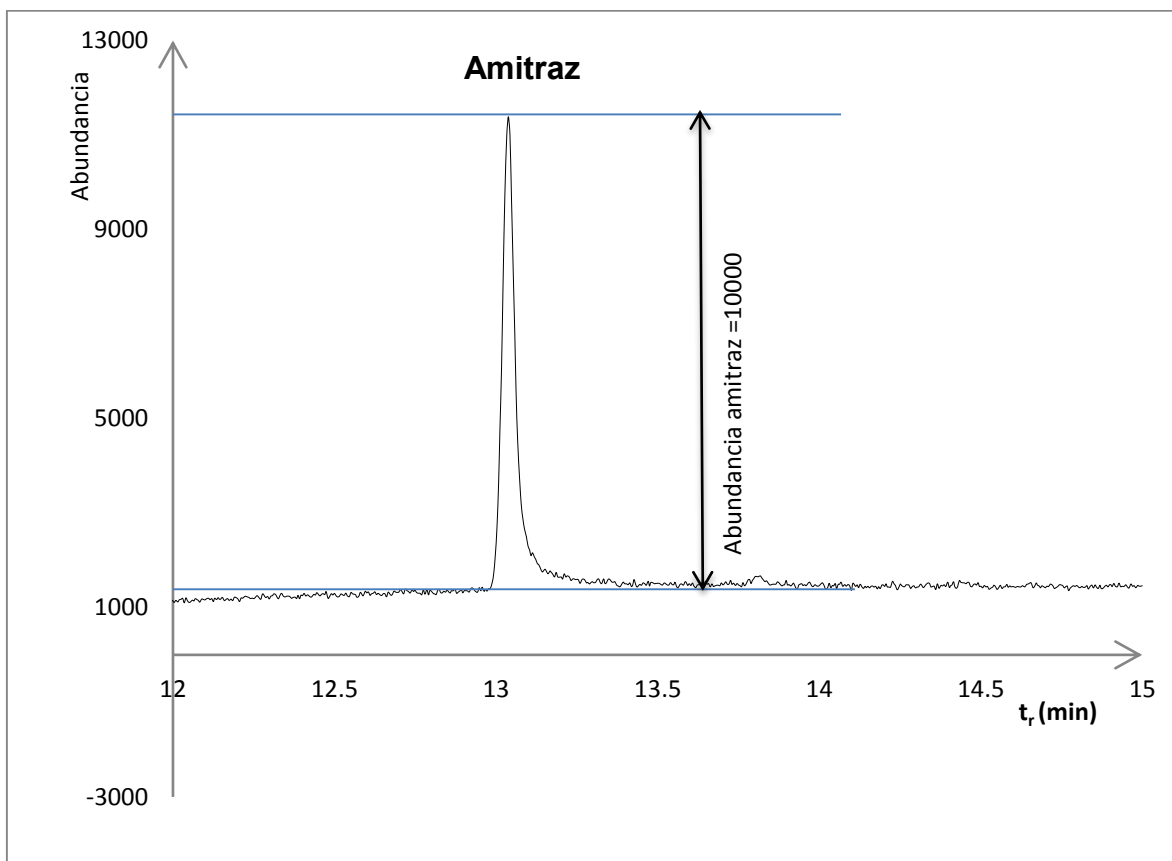
5.1.4 Límite de detección

En cromatografía es común definir el límite de detección como la concentración de un pico que presenta una relación señal/ruido (S/N) de 3. En el punto 5.1.2 se demostró el comportamiento lineal de la respuesta y de la concentración, por lo que es válido tomar la señal de fondo (**Cromatograma 4**), multiplicarla por 3 y calcular la concentración correspondiente utilizando una proporción lineal con la muestra enriquecida con Amitraz de concentración de estudio 2 mg/L (la señal ampliada y medida se presenta en el **Cromatograma 5**). Utilizando esta relación, se puede calcular un límite de detección de 0.1 mg/L.



Cromatograma 4. Ruido de fondo en las cercanías del pico de Amitraz, para una muestra enriquecida

No es necesaria una mayor precisión en este límite, dado que las muestras deben estar, en principio, en una concentración mayor (20-200 mg/L).



Cromatograma 5. Intensidad de la señal de un pico correspondiente a 2 mg/L de Amitraz adicionados a una muestra agotada

5.1.5 Efecto de la matriz y linealidad del método (Exactitud en el intervalo de calibración)

En el punto anterior se demostró que la matriz no presenta ningún pico que coeluya con el Amitraz, sin embargo, también es necesario demostrar que ningún componente de la matriz pueda “secuestrar” químicamente al analito de interés, con lo que se afectaría la exactitud de la medición y tendríamos un error sistemático. Para demostrar la ausencia de este efecto de matriz se tomó una muestra agotada como representativa de la matriz y se le añadieron diferentes cantidades de Amitraz, se analizaron estas muestras y se cuantificó por Cromatografía de gases el analito. El **Gráfico 3** demuestra estadísticamente que la pendiente de la cantidad cuantificada en función de la cantidad



adicionada real es igual a uno, así como la ordenada al origen es cero. Las pruebas de hipótesis correspondientes se presentan en la **Tabla VII**.

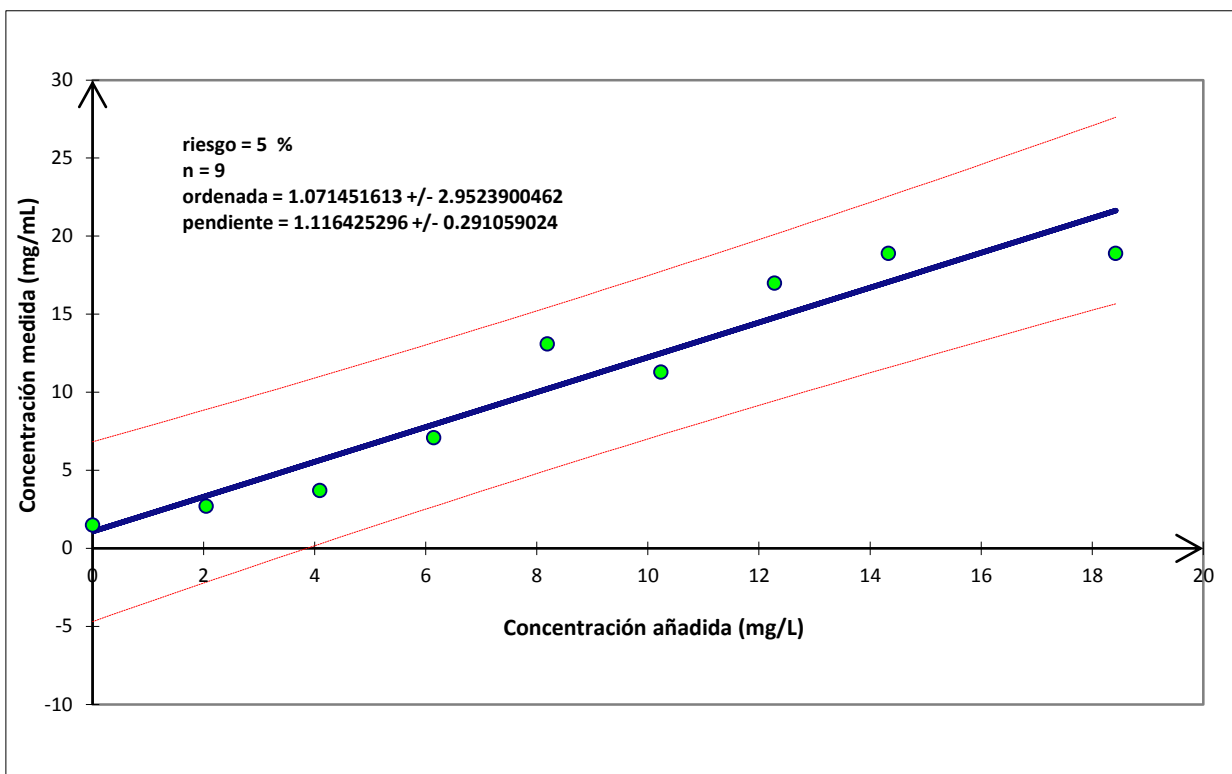


Gráfico 3. Linealidad del método (exactitud) de Amitraz por GC/MS (SIM)

Tabla VII. Pruebas de hipótesis sobre la ordenada y la pendiente para demostrar la exactitud en la determinación de Amitraz por GC/MS (ausencia de errores sistemáticos)

Hipótesis sobre la ordenada, regresión $b = 1.07145161$		riesgo $\alpha = 0.05$		
H₀: $b = 0$				
hipótesis alterna:	t de Student	t de Tablas	Resultado	Decisión
H₁: $b \neq 0$	0.85814546	2.36462425	$t_{Student} < t_{tablas}$	Aceptar H₀
Hipótesis sobre la pendiente, regresión $m = 1.1164253$		riesgo $\alpha = 0.05$		
H₀: $m = 1$				
hipótesis alterna:	t de Student	t de Tablas	Resultado	Decisión
H₁: $m \neq 1$	0.9458634	2.36462425	$t_{Student} < t_{tablas}$	Aceptar H₀



5.1.6 Reproducibilidad intermedia

Para demostrar la reproducibilidad inter-laboratorios se repitió el análisis en otro laboratorio, usando el mismo modelo de equipo y la misma columna enlistados. La curva de calibración es estadísticamente igual, como lo demuestra la comparación de ordenada y pendiente del **Gráfico 1** con el **Gráfico 4**, se trabajó con las pruebas de hipótesis que se presentan en la **Tabla VIII**.

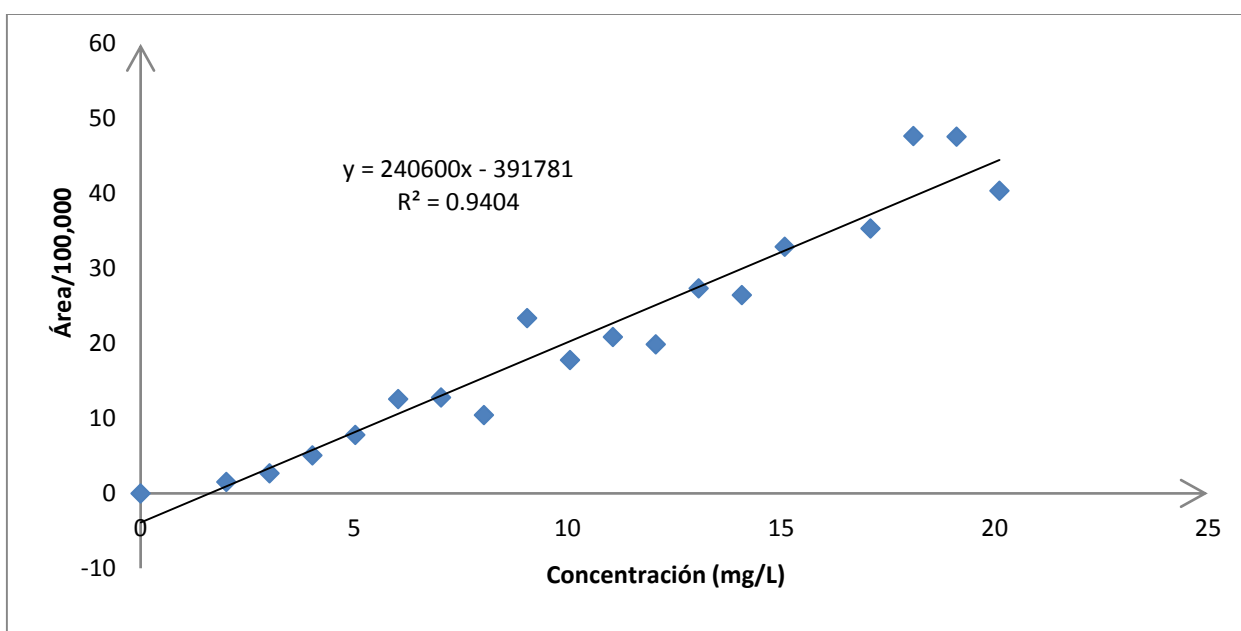


Gráfico 4. Curva de calibración de Amitraz por GC/MS (SIM), mismo método, segundo operador, mismos modelos de equipo y columna



Tabla VIII. Pruebas de hipótesis de comparación entre las dos curvas de calibración de los gráficos 1 y 4 (Reproducibilidad intermedia).

Hipótesis sobre la ordenada					
Ho: - 391780 =	-375925				
hipótesis alterna:		t de Student	t de Tablas	Resultado:	Decisión ($\alpha=0.05$):
H1: - 391780 \neq	-375925	-0.0915396	2.10981558	$t_{\text{student}} < t_{\text{tablas}}$	Aceptar Ho
Hipótesis sobre la pendiente					
Ho: 240599 =	253323				
hipótesis alterna:		t de Student	t de Tablas	Resultado:	Decisión ($\alpha=0.05$):
H1: 240599 \neq	253323	-0.86646305	2.10981558	$t_{\text{student}} < t_{\text{tablas}}$	Aceptar Ho

5.1.7 Repetibilidad

En la **Gráfico 5** se muestra la repetibilidad de tiempos de retención para diferentes muestras y en diferentes días, durante dos meses.

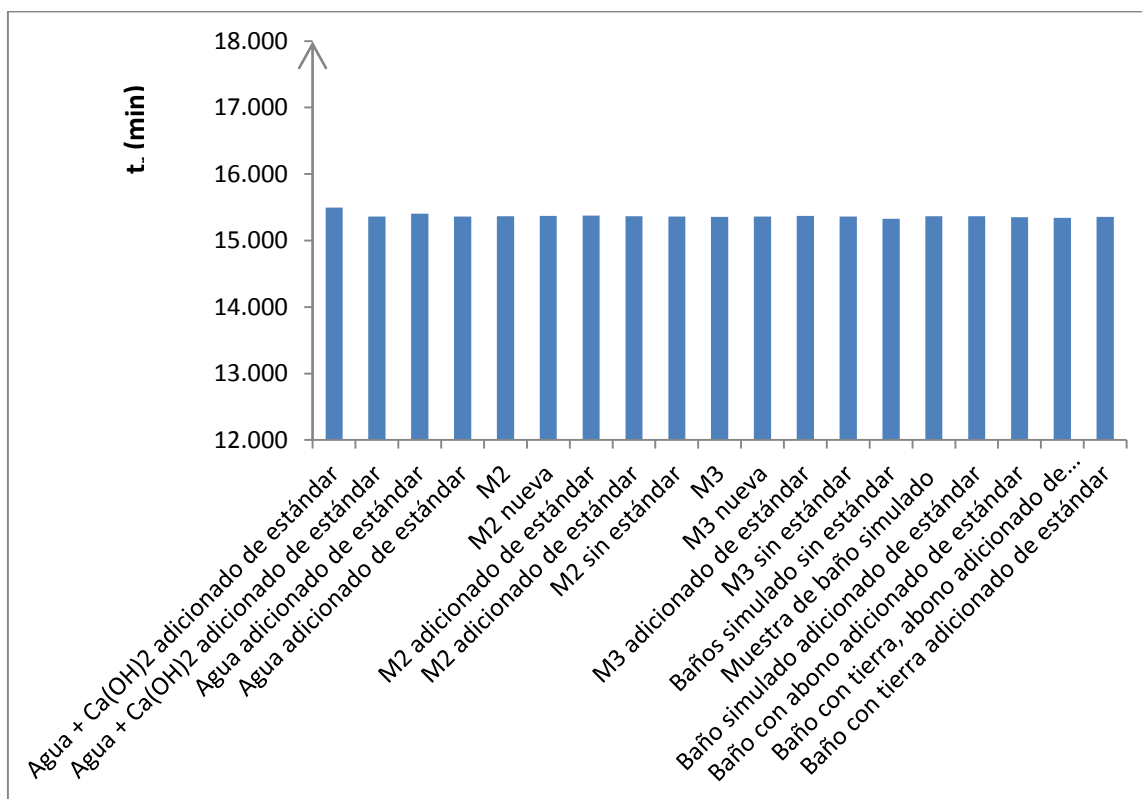


Gráfico 5. Repetibilidad de los tiempos de retención durante el desarrollo experimental



5.2 Método de campo por UV

5.2.1 Selección de la longitud de onda de máxima absorción

La **Figura 15** muestra el espectro de absorbancia del Amitraz en disolución agua/THF (5:95 % v/v). En este se observa claramente que el máximo de absorción se encuentra entre 310 y 315 nm. En hexano se obtenían resultados semejantes, pero para analizar muestras hubiera sido necesario extraer el Amitraz de los baños, lo que no cumplía con el objetivo general del proyecto. Con los otros disolventes las muestras no eran lo suficientemente estables.

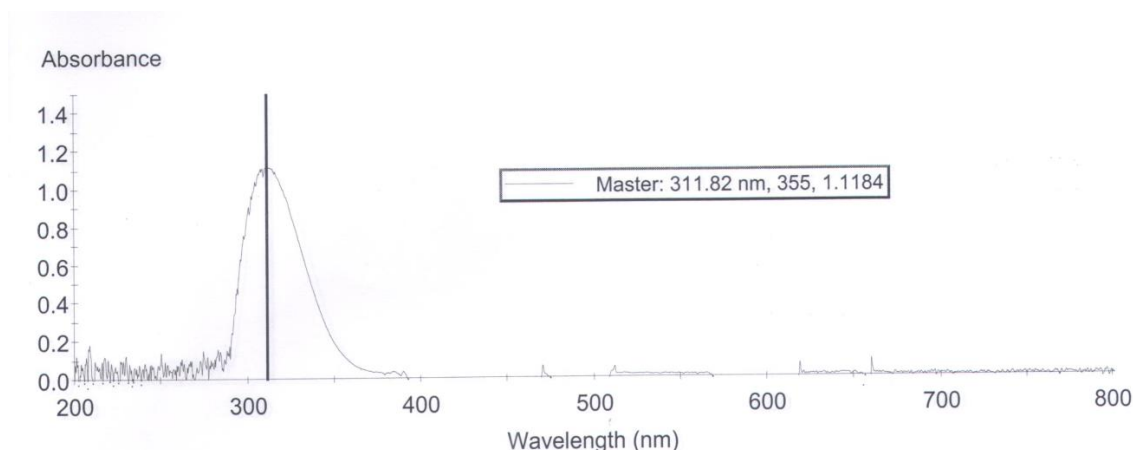


Figura 15. Espectro de absorción de Amitraz en H₂O/THF (5:95 % v/v)

5.2.2 Linealidad del sistema

Se trazaron recurrentemente curvas de calibración en el intervalo de 0-20 mg/L, en las que se encontró un comportamiento completamente lineal, como lo demuestran la recta del **Gráfico 6** y el gráfico de residuos aleatorio y homocedástico de la misma (**Gráfico 7**).

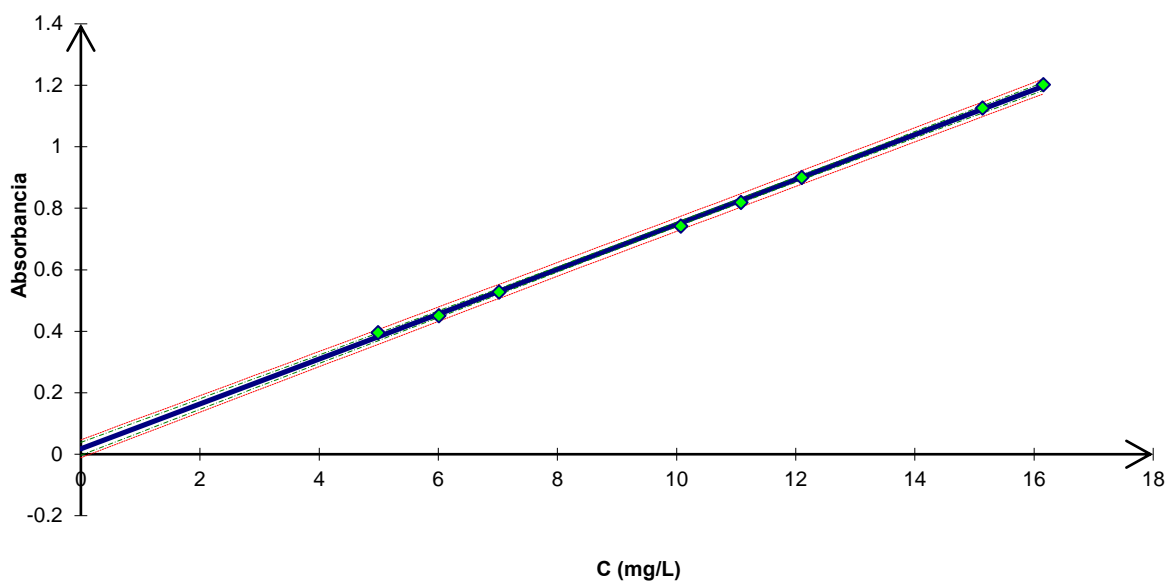


Gráfico 6. Curva de calibración del Amitraz en agua/THF 5:95 % v/v por espectrofotometría UV (λ 314.4 nm)

Tabla IX. Linealidad del sistema UV

			Incertidumbre, 95 % de confianza
No. de datos	8		
Ordenada	0.018	+/-	0.021
Pendiente	0.073	+/-	0.0019
Coeficiente de correlación	0.9997		

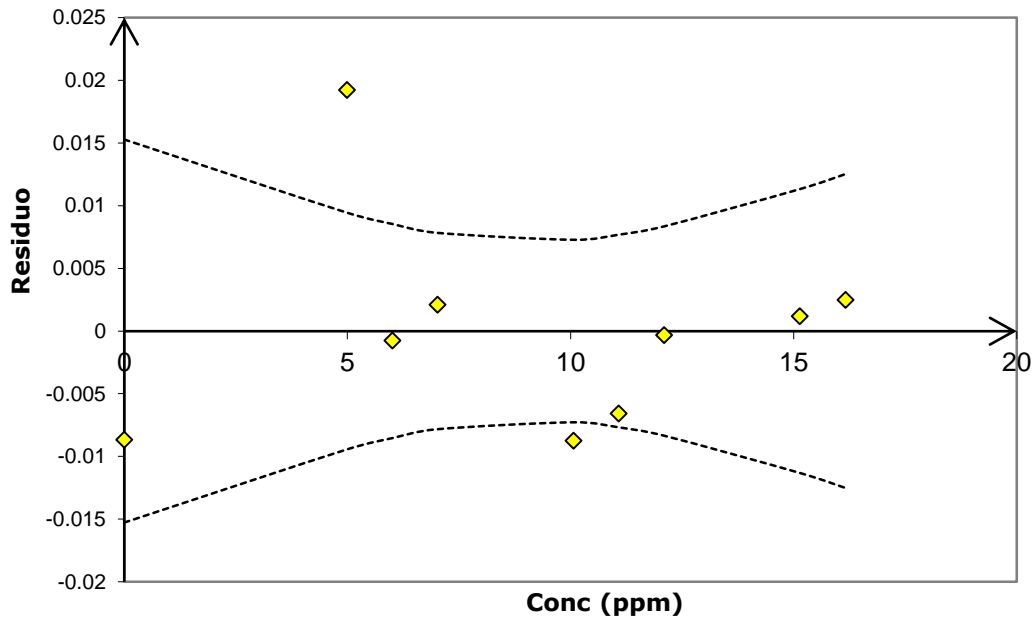


Gráfico 7. Residuos de la curva de calibración de la Gráfico 6

5.2.3 Repetibilidad

Se estudió la repetibilidad del método en un período de diez días. El **Gráfico 8** muestra las variaciones de la pendiente de la curva de calibración en este período. En éste, se demuestra que el método es repetible, con variaciones máximas del 8.6 %.

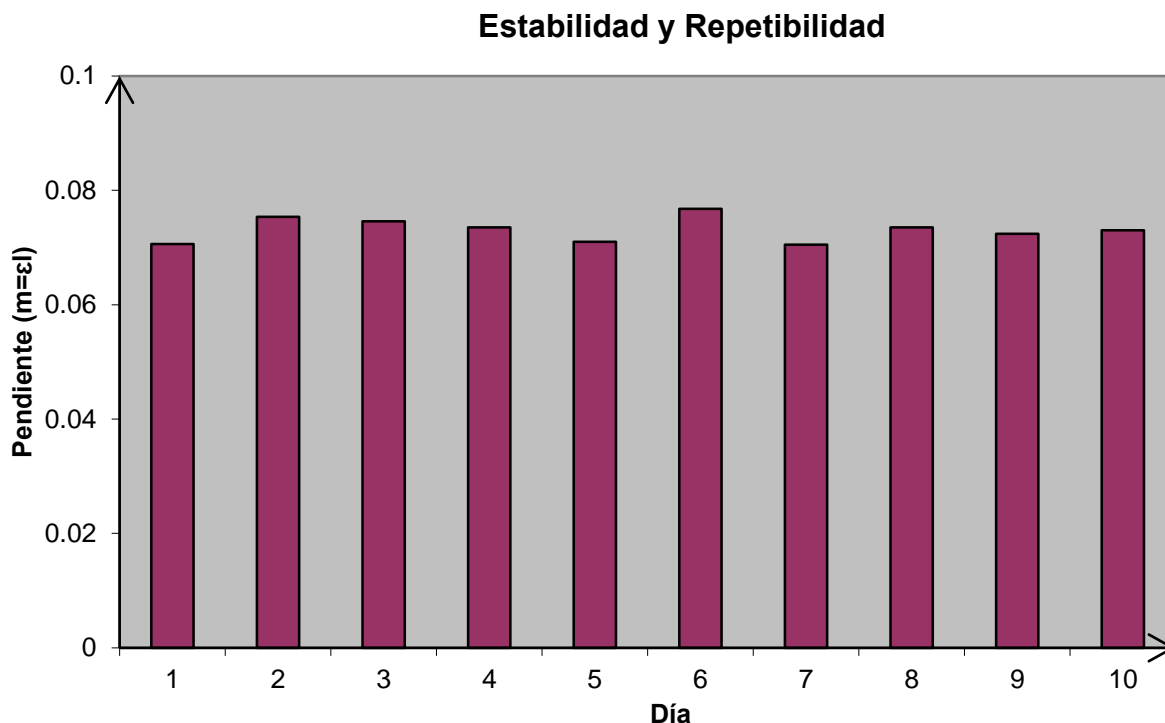


Gráfico 8. Variaciones de la pendiente de la curva de calibración

La hidrólisis del Amitraz en THF/H₂O es lenta como se puede observar en el **Gráfico 8**, ya que el estándar es estable en esta mezcla. Por otro lado, en los baños esta estabilidad está regida por el pH del conservador en la disolución [agua + Ca(OH)₂ (conservador)]. En estos baños una pequeña variación del pH puede influir grandemente en la estabilidad del Amitraz, así como en su acción contra las garrapatas. En las muestras de los baños reales se puede apreciar que la concentración del Amitraz está por encima de la recomendada.

5.2.4 Límite de detección

Considerando que en las curvas de calibración los datos son homocedásticos la magnitud del error no se incrementa con la



concentración (**Tabla IX**). Se evaluó el límite de detección en base a la regresión lineal, tal y como se ilustra en el **Gráfico 9** una segunda condición es que el intervalo de valores utilizado incluya valores cercanos al límite obtenido, y que el valor máximo utilizado no exceda en un orden de magnitud este límite. El límite de detección observado es de 2.37 mg/L.

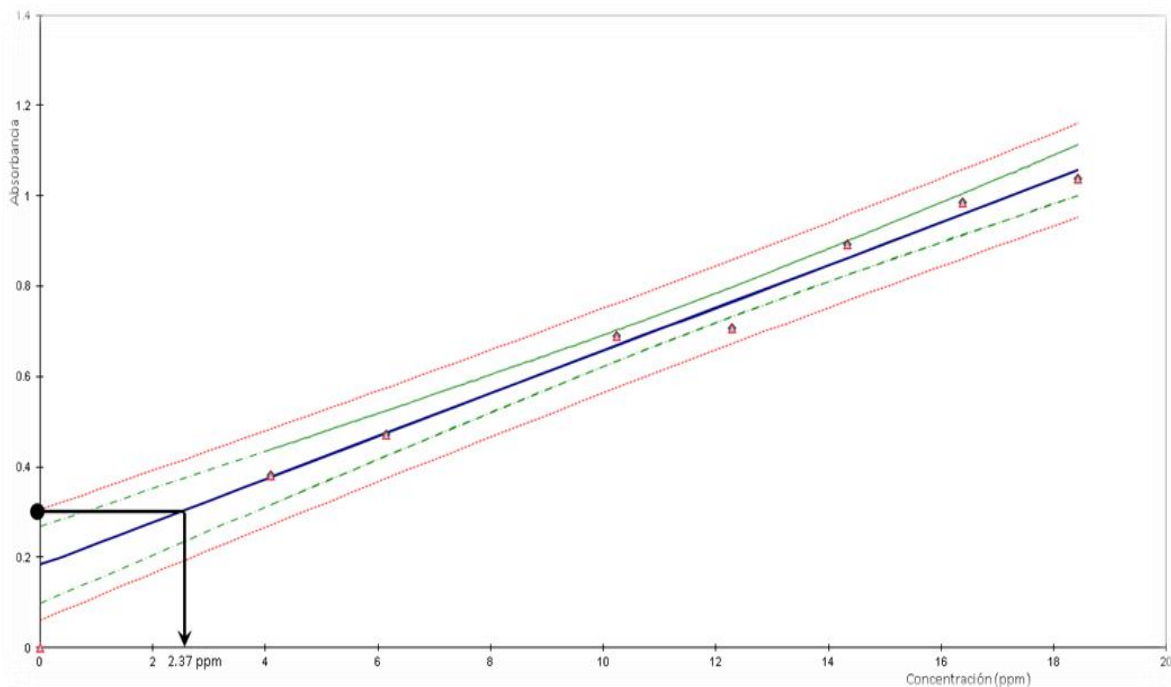


Gráfico 9. Límite de detección

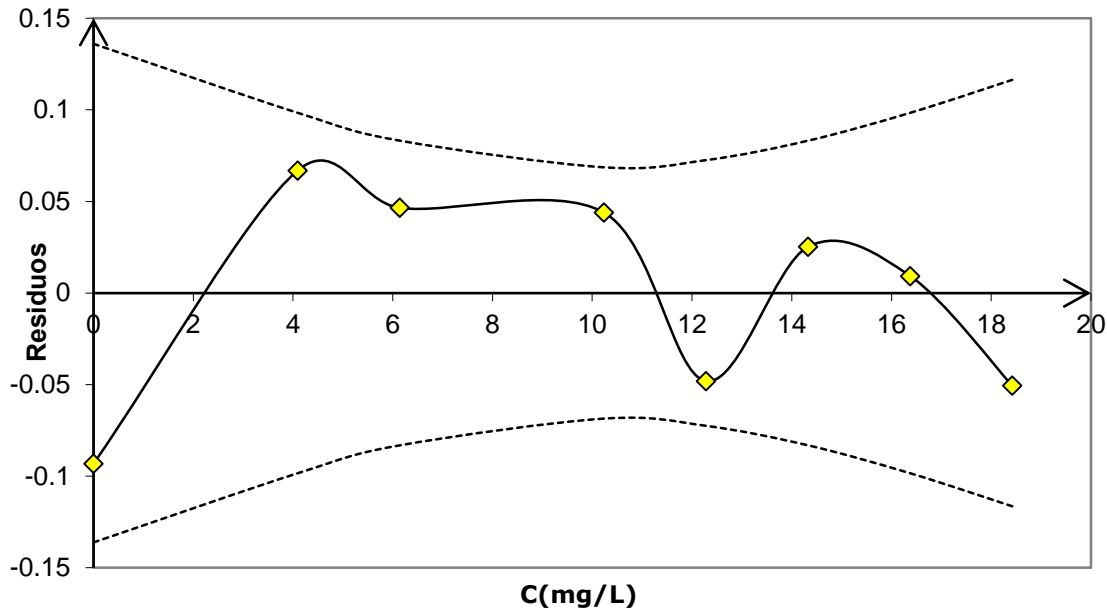


Gráfico 10. Residuos de la linealidad cerca del límite de detección

5.2.5 Efectos de la matriz

Baños simulados agregando tierra de jardín y abono de borrego.

Tabla X. Efectos de la matriz en baños simulados

Muestra	Tierra añadida (g/mL)	% Recobro
A1	0.01009	12.5
A2	0.01004	24.8
A3	0.01007	42.6
B1	0.02007	11.7
B2	0.02002	30.9
B3	0.02004	25.8
C1	0.03009	11.4
C2	0.03002	15.8
C3	0.03003	3.4



La tierra añadida tuvo gran influencia en la concentración de Amitraz presente en los baños, esta interferencia absorbe el Amitraz, como se observa en la **Tabla X**, por lo que la efectividad de los baños se ve disminuida. Esto sólo es un factor. si se le suman el pelo, la materia fecal, la disminución del agua en los baños cuando se saca el ganado del baño, entonces las recargas tendrían que ser más eficientes, aunque en los baños reales hay una mayor cantidad de Amitraz, se podría decir que las recargas son mayores a la inicial, porque en la cuantificación por Cromatografía de gases de los baños viejos reales, la concentración fue aún mayor a 200 mg/L, al no tener un control del nivel real del ixodicida, existe el riesgo de que las garrapatas vayan creando resistencia a éste. El problema es más complejo aún, por un lado la concentración es aparentemente elevada (como lo demuestra el análisis por GC/MS que reporta concentración total en el medio) pero por otro lado la concentración en disolución es inferior a los valores recomendados, como lo reporta este estudio realizado. Todo esto significa que se necesita un mecanismo de campo que mida la actividad del ixodicida en los baños de inmersión donde se utilice y que por los resultados obtenidos, seguramente las recargas necesitan mayor cantidad de este analito por la presencia de la tierra y de otras interferencias que lo absorben. Queda aún por demostrar que la hidrólisis del Amitraz no genere otras interferencias que provoquen un aumento de la señal en el método de campo.

5.2.6 Exactitud

Se tomaron muestras de baños viejos reales y se les añadió Amitraz en concentración conocida, usando un método de adición de estándar, los resultados se muestran en el Gráfico 11.

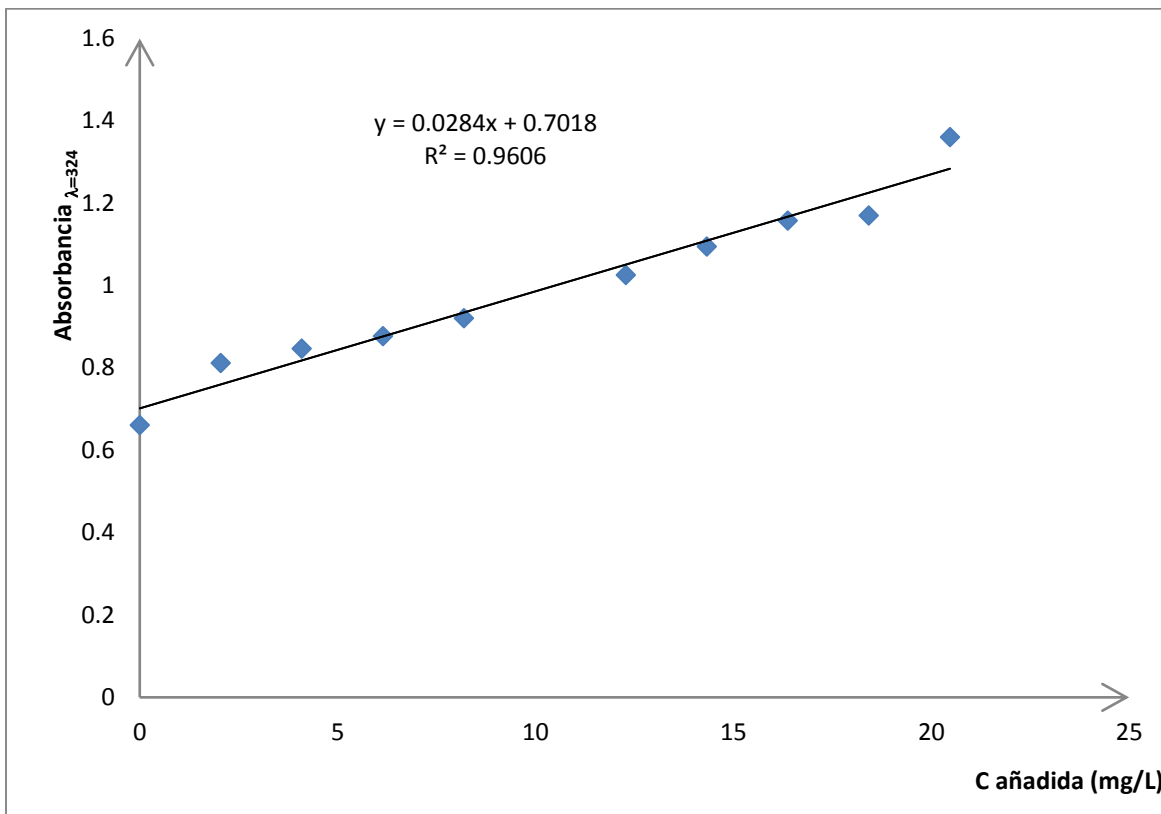


Gráfico 11. Curva de calibración por adiciones patrón por la técnica de UV

Para conocer la exactitud de un método en matrices complejas se interpolan los resultados de las muestras en la curva de calibración respectiva y evaluar los resultados por medio de la pendiente (**Gráfico 12**).

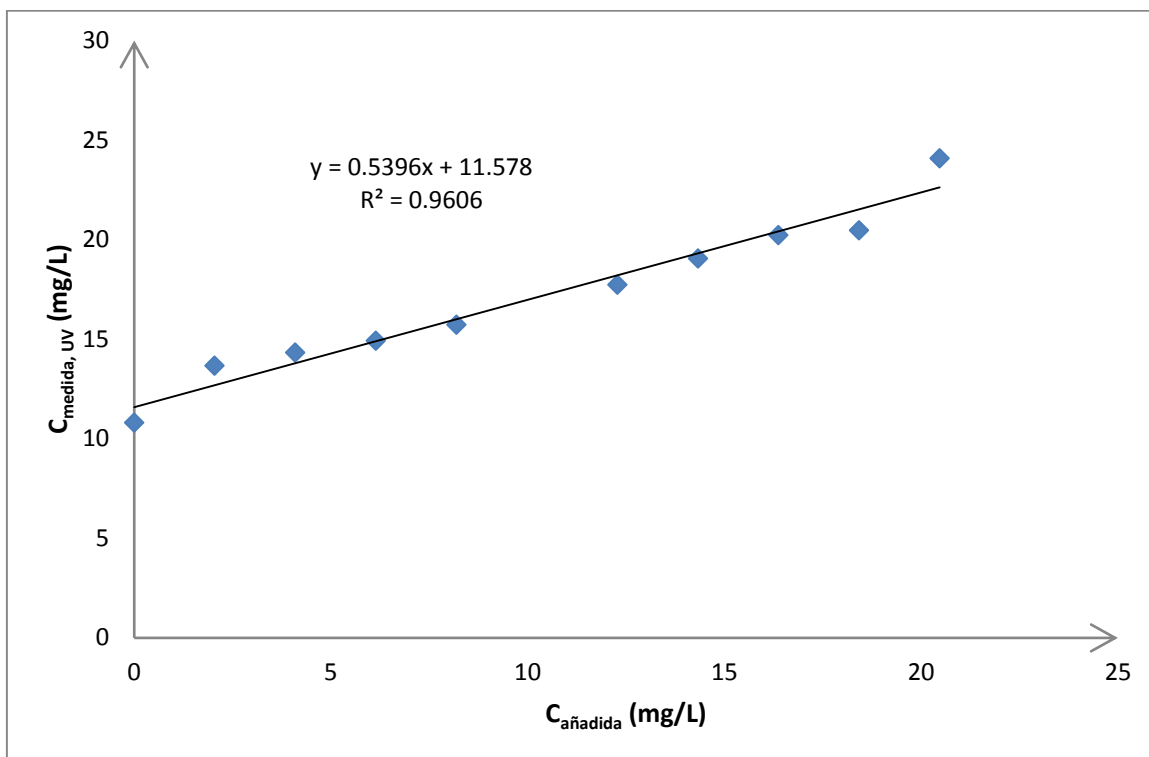


Gráfico 12. Evaluación de la exactitud por $C_{añadida}$ y C_{medida} del Amitraz en UV interpolando en la curva de calibración UV

Como se observa en el **Gráfico 12**, la pendiente es claramente inferior a uno (con un nivel de confianza estadístico del 95 %, el riesgo de equivocarnos es 3.8×10^{-5} %), lo que corrobora la prueba con baños simulados. El método presenta un error sistemático proporcional por defecto, es decir, el valor que reporta es inferior al valor real. Generalmente esta prueba es muy usada para demostrar exactitud de métodos de medición en matrices complejas. Decidimos cuestionar su validez y evaluar si la ordenada al origen es un valor real o además el método presenta un error sistemático constante, por lo que se efectuó un segundo experimento para probar la exactitud o corroborar los resultados y obtenidos.



5.2.7 Exactitud y efectos de la matriz por UV mediante la linealidad del método

Como contábamos con dos métodos de medición, y el primero de ellos (GC/MS) demostró ser exacto, decidimos evaluar la exactitud real del UV contrastando los resultados por UV contra GC/MS para una misma muestra real enriquecida. Los resultados se muestran en el **Gráfico 13**.

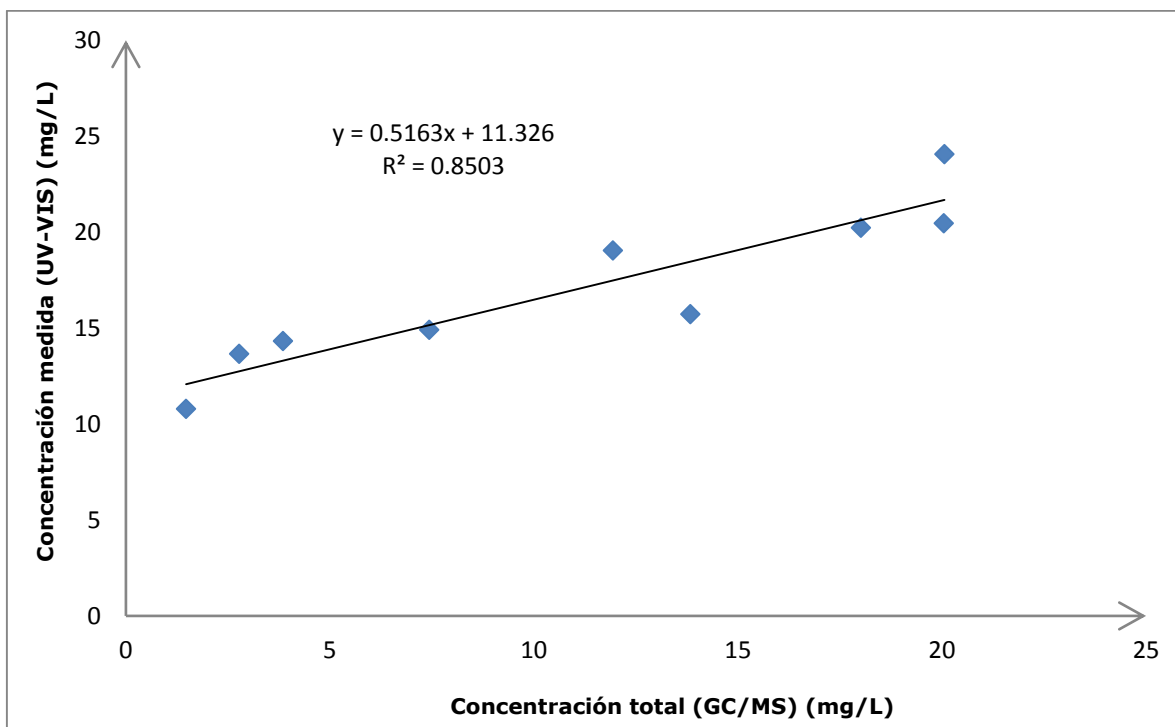


Gráfico 13. Evaluación de la exactitud en UV comparando contra la concentración medida por GC/MS

Aunque los resultados de ordenada y pendiente son prácticamente iguales a los del **Gráfico 12**, el significado es muy diferente. En el **Gráfico 12** se observa un proceso de falta de exactitud por un error sistemático proporcional (la pendiente es aproximadamente 0.54). Este resultado puede explicarse por un fenómeno de adsorción del Amitraz en los sólidos presentes en la matriz. La ordenada diferente de cero del **Gráfico 12** sólo puede adjudicarse al hecho de que se trata de una



matriz enriquecida, por lo tanto la concentración medida cuando no se había agregado Amitraz (11.58 mg/L debe corresponder a la concentración de Amitraz en la muestra inicial). El **Gráfico 13**, por el contrario demuestra dos causales de falta de exactitud. En primer lugar, tenemos el ya demostrado error sistemático proporcional (la pendiente es 0.52 en lugar de lo esperado de uno). Además, los resultados demuestran un error sistemático constante. Es decir, la muestra inicial no contiene Amitraz, y la concentración aparente medida por UV (11.33 mg/L) en realidad corresponde a la absorción de la radiación electromagnética por los productos de degradación del principio activo, que no tienen actividad ixodicida.



VI. CONCLUSIONES

La cuantificación de Amitraz en los baños de inmersión a pesar de las interferencias, presentes hacían notar que había una mayor concentración de la que se requiere normalmente, esto dará como consecuencia la resistencia de las garrapatas a largo plazo, porque aunque se aumente la concentración de Amitraz en los baños no aumenta su efectividad.

El método de campo por Ultravioleta (UV) demostró carecer de exactitud debido a que las interferencias absorben a la misma longitud de onda. Sin embargo, aunque también se encontró que tenía errores sistemáticos proporcionales, este resultado es rebatible y actúa en defensa de esta técnica. Al recargar baños viejos con Amitraz, práctica común en el campo, ocurre que buena parte del mismo es absorbido por los sólidos en suspensión. Al estar absorbido, aunque los sólidos se depositen sobre el pelo y la piel del hospedero, no actúan sobre el parásito. Únicamente el principio activo en disolución, cuantificable por ultravioleta, tiene actividad ixodicida, por lo que si bien la técnica es incapaz de medir la concentración total de Amitraz, es perfectamente capaz de medir cuanto del Amitraz añadido en una recarga permanece activo, utilizando una técnica relativa similar al método de altas concentraciones. En términos prácticos, el blanco en la calibración sería el mismo baño antes de la recarga.

El método de referencia de laboratorio, Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas pasó todas las pruebas de validación. Sin embargo, la conclusión de este trabajo es que este método cuantifica la concentración total del Amitraz en el medio, que como ya se discutió, es generalmente mayor a la concentración activa



del mismo. Para que este método sea útil debe trabajarse la muestra intacta para cuantificar el Amitraz, pero también debe trabajarse la muestra libre de partículas suspendidas (centrifugada) para así cuantificar solo el Amitraz en disolución, es decir, el Amitraz activo. Este último conjunto de experimentos no se realizó, ya que se encontraba fuera de los alcances en tiempo y recursos del proyecto original.



VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. 1. Mazari-Hiriart, M. y Castillo-Cruz, R. Comunicaciones personales. 2014.

VII. 2. Manual Técnico. Control de Parásitos Internos Y Externos Que Afectan Al Ganado Bovino En Yucatán, México. Rodríguez, V.R.I. y otros. Yucatán, México (2011) pág. 19, 23, 24.

VII. 3. Los Plaguicidas En México. Restrepo, I. Comisión Nacional de Derechos Humanos. México D.F (1992) pág. 189-193.

VII. 4. Selfa, J. y Anento J.L. Plagas agrícolas y forestales. Boletín S.E.A. Los Artrópodos y el hombre [20]. 75-91 (1997).

VII. 5. Acarología. Doreste, S. E. Edit. IICA. 2a ed. San José, Costa Rica (1988) pág. 41-47.

VII. 6. Las Garrapatas de La República de Colombia. Mesa, E.O. edit. Imprenta Nacional. Colombia (1939) pág. 58-64.

VII. 7. Plan estratégico de la campaña nacional contra la garrapata *Boophilus spp.* en México 2008-2012.

ampave.org/archivos_apoyo/Manual_tecnico.pdf. (Consultado Junio 5, 2013).

VII. 8. Manzano, R. y otros. Garrapatas: características anatómicas, epidemiológicas y ciclo vital. Detalles de la influencia de las garrapatas sobre la producción y sanidad animal. Sitio Argentino Producción Animal. (2012) pág. 1-8.

www.produccion-animal.com.ar (consultado Octubre 2014)

VII. 9. Manual Técnico Para El Control de Garrapatas En El Ganado Bovino. Rodríguez, R.I. y otros. INIFAP. México D. F. (2006) pág. 1-5.



- VII. 10. Iraola V. Introducción a los ácaros (I): Descripción general y principales grupos. Bol. SEA. Los Ártropodos y el hombre [23], 13-19 (1998).
- VII. 11. Solorio Rivera JL, Rodríguez Vivas RI. Epidemiología de la babesiosis bovina. I. Componentes Epidemiológicos. Rev Biomed. 8 [1], 37-47 (1997)
- VII. 12. Rhipicephalus (Boophilus) microplus. The Center for Food Security and Public Health. Iowa State University.
http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/boophilus_microplus.pdf.
[Consultado en Junio 5, 2013].
- VII. 13. (SENASICA/SAGARPA). Garrapata Boophilus spp. Actualizado en Diciembre 23, 2013.
<http://www.senasica.gob.mx/?id=4373>. [Consultado en Enero 25, 2014].
- VII. 14. Cetrá, B. Garrapata común del bovino. EEA Mercedes INTA, Corrientes, Noticias y Comentarios [352]. Sitio argentino de Producción Animal.
www.produccion-animal.com.ar. [Consultado en Julio 5, 2013].
- VII. 15 Eduardo, S, Villalba L. Manejo integral de las garrapatas una propuesta eficiente y sostenible con el medio ambiente. *Revista Agronomía*. 16 [2] 13-21 (2010).
- VII. 16. Control Biológico de las garrapatas. Fernández, R.M. *Laboratorio de Control Biológico Unidad de Artrópodos* CENID-PAVET-INIFAP. Jiutepec, Morelos, México (2011) pág. 518-544.*
- VII. 17 SEMARNAT. Plaguicidas.



<http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/768-sqre-plaguicidas>.

(Consultado 2013)

VII. 18 Sánchez, M.M.J. y Sánchez, C.M. Los Plaguicidas. Adsorción Y Evolución En El Suelo. Edición electrónica promovida por CeresNet. España (1984) pág. 51.

VII. 19 Chubut, G. del. Manual de Producción Ovina. Chubut 240.

VII. 20. Rosario, C.R. y Domínguez, G.D.I. Estrategias Para El Control de La Garrapata *Boophilus Microplus* Y La Mitigación de La Resistencia a Los Pesticidas. Jiutepec, Morelos (2009) pág. 22.

VII. 21. Hollingworth, R.M. Chemistry, biological activity, and uses of formamidine pesticides. *Environ. Health Perspect.* 14 (1976) 57-69.

VII. 22. Korta, E. et al. Study of acaricide stability in honey. Characterization of amitraz degradation products in honey and beeswax. *J. Agric. Food Chem.* 49 [12] (2001) 5835-5842.

VII. 23 Li, A.Y. et al. Detection and Characterization of Amitraz Resistance in the Southern Cattle Tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). 41 [2] (2004) 193-200.

VII. 24. EPA. USEPA. AMITRAZ. (1996) pág. 206.

VII. 25 Mario, C.D. y Aramburu, R. Boletín de patentes. (2007) pág. 50.

VII. 26 Introducción a la Química Orgánica. Brown, W.H. Compañía Editorial Continental. 2ª Edición. México (2002) pág. 543.

VII. 27 Química Analítica Contemporánea. Judith, F.R. Kenneth, A.R. Editorial Hall P. México (2000) pág. 318.



- VII. 28 Amézquita, L.F. y Mendoza, O.D. Taller Básico de Espectroscopía UV/VIS. Universidad de Guanajuato, México. (2008) pág.1-53.
- VII. 29 Förster, H. UV / VIS Spectroscopy. *Mol. Sieves* 4 (2004) 337-426.
- VII. 30 Práctica 1. Reconocimiento de Biomoléculas.
<https://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/bolarios/BiologiaCCAA/Guiones/Practica1.htm>. [Consultado Diciembre 2010].
- VII. 31 McNair, H.M. Cromatografía de Gases. Edit. OEA. Washington D.C. (1981) pág. 3-8.
- VII. 32 Laura, Olguín P, Héctor, Magadán MR. Métodos En Biotecnología; Cromatografía de Gases: Instituto de Biotecnología, UNAM México D.F. (2004). 7-20.
- VII. 33 Plascencia, V.G. Curso de Métodos, Espectrometría de Masas: Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, Morelos, México (2003).
- VII. 34 Análisis Químico Cuantitativo. Harris, D.C. Editorial Reverté. 2^a edición. México D.F (2001).
- VII. 35 Química Orgánica. Wade LG. Editorial Prentice Hall Hispanoamericana, S.A. 2^a edición. México (1993) pág. 510-511.
- VII. 36 Castañeda, M. y otros. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Sci. Tech.* 13 [33] (2007) 165-166.*
- VII. 37 La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor [en línea]. Gutiérrez



MC, Droguet M. Universidad Politécnica de Cataluña: Editor Instituto de Investigación T xtil y Cooperación Industrial. [122] (2002) 35-41.

<<https://upcommons.upc.edu/revistes/bitstream/2099/2733/1/5CROMGASES.pdf>>

VII. 38 García, P. y otros. Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. *Rev. Chil. Infectología*. 29 [3]. (2012) 263-272.

VII. 39 EURACHEM. Métodos An liticos Adecuados a Su Propósito; Guía de Laboratorio Para La Validación de Métodos Y Temas Relacionados. Editorial CENAM. 2a edición. Los Cu es, Querétaro. México (2005).

VII. 40 Duffau, B. y otros. Validación de Métodos Y Determinación de La Incertidumbre de La Medición: Aspectos Generales Sobre La Validación de Métodos. Editorial Instituto de Salud Pública. Santiago, Chile (2010).

VII. 41 2007-2014.  PJ. PARASITIPEDIA.net.

http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=457&Itemid=594.

VII. 42 Zimmermann, G. Uso y manejo de los baños de inmersión para el control de la garrapata común del bovino (*Boophilus Microplus*). (2008) 1-3.

VII. 43. Manual de Control Integral de la Garrapata Rhipicephalus (*Boophilus*) microplus del Ganado Bovino en el Estado de México. Rojas, R.E.E. y otros. Folleto Técnico No. 11. INIFAP. México (2011) pág. 39.



VIII. ANEXOS

8.1 Anexo A: Conceptos

1. **Áfido:** Sinónimo de pulgón; *Zool.* Insecto del orden Hemíptero, de hasta 3 mm de longitud, con la cabeza estrecha, el abdomen bulboso y las alas posteriores mucho mayores a las posteriores.
2. **Anaplasmosis:** Es una infección no contagiosa del ganado bovino. Se caracteriza por anemia e ictericia asociadas por la presencia de ciertos cuerpos en los eritrocitos, llamados anaplasmas. Afecta a todas las razas de bovinos y a otros rumiantes.
3. **Basesiosis bovina:** es una enfermedad febril transmitida por garrapatas o causada por uno o más parásitos protozoarios del género *Babesia* que generalmente se caracteriza por una lisis eritrocítica extensiva que conduce a anemia, ictericia, hemoglobinuria y muerte.
4. **Blanco matriz:** Matriz que no contiene el analito de interés u objetivo para el método seleccionado.
5. **Boophilus:** Garrapata de un hospedero, transmisor de la babesiosis y anaplasmosis a los animales domésticos y silvestres.
6. **Colémbolos.** *Zool.* Orden (*Collembola*) de la clase de insectos, formados por pequeños artrópodos ápteros, con un apéndice en el extremo del abdomen, que utilizan como palanca para saltar.



- 7. Coleópteros.** *Zool.* Orden (*Coleóptera*) de la clase de insectos. Formado por artrópodos con las alas anteriores, o élitros, endurecidas para proteger a las alas posteriores voladoras. Es el mayor orden de insectos, con unas 300000 especies. Comprende los escarabajos y los gorgojos.
- 8. Dípteros.** *Zool.* Orden (*Díptera*) de la clase de insectos formado por artrópodos con las alas posteriores reducidas a pequeños órganos del equilibrio. Comprenden las moscas, los mosquitos y los tábanos.
- 9. Ectoparásito:** parásito que lleva a cabo su función sobre la superficie externa del huésped.
- 10. Efecto matriz:** Con frecuencia la concentración previa o preconcentración forma parte de la etapa de la recolección de la muestra; los materiales de interés se reducen a una muestra más concentrada, y los analitos se remueven de gran parte de la matriz de la muestra durante la recolección. La matriz de la muestra corresponde a la parte del material que no es de interés para el análisis.
- 11. Garrapatas.** *Zool.* Arácnido del orden *Ácaros*, que puede alcanzar los 3 cm de longitud. Se alimentan de sangre, que succiona de reptiles, aves y mamíferos, y es vector de muchos virus.
- 12. Gas portador:** se le denomina fase móvil, es un gas inerte cuya finalidad es transportar las moléculas de muestra a través de la columna ^{VII. 33}.



- 13. Hematófagos:** animal que se alimenta de la sangre de otros animales.
- 14. Ixodicidas:** se les denomina a veces así a los garrapaticidas que son antiparasitarios externos.
- 15. Límite de detección:** es la concentración más baja de un analito que el proceso analítico detecta en forma confiable. Es un valor que se obtiene por extrapolación y se calcula para el mejor conjunto posible de condiciones con interferencias mínimas.
- 16. Matriz:** es el tipo de sustancia compuesta (líquida, sólida, gaseosa) que puede o no contener al analito de interés, ejemplo, matriz de alimento, matriz ambiental, etc.
- 17. Pie de baño:** cantidad de producto expresado en litros/1000 litros de agua al preparar el baño ^{VII. 41}.
- 18. Plaga:** es la aparición masiva y repentina de seres vivos de la misma especie que causan graves daños a poblaciones animales o vegetales, como, respectivamente, la peste bubónica y la filoxera.
- 19. Refuerzo en seco:** es el producto agregado sin reponer agua, para reforzar la acción garrapaticida. **IMPORTANTE:** No es igual al refuerzo y reposición, además no corrige malos manejos anteriores ^{VII. 41}.
- 20. Refuerzo:** es el producto necesario para restituir el principio activo llevado por arrastre con el pasaje de los animales. Esta



actividad debe realizarse cada vez que desciende el nivel, 1000 litros de su capacidad ^{VII. 41}.

- 21. Reposición:** la cantidad de producto que debe agregarse conforme a los litros de agua incorporados para recuperar el nivel inicial. Esta actividad debe realizarse cada vez que el baño desciende 1000 litros de su capacidad ^{VII. 41}
- 22. Entomopatógeno:** (en sensu lato: patógeno de insectos y ácaros): cualquier agente biótico, normalmente microscópico que origina enfermedad en artrópodos.
- 23. Colorímetro:** equipo que permite la cuantificación de un color y la comparación con otro.
- 24. Espectrofotómetro:** determinaciones en cualquier longitud de onda de la región del espectro electromagnético Ultravioleta/Visible, o incluso puede medir la absorción de la radiación.



8.2 Anexo B: Forma de preparación de los baños de inmersión para el ganado bovino

Baños de inmersión:

- **Carga:** añadir 1.6 litros de producto y 6 kg de conservador simultáneamente por cada 1 000 litros de agua (equivale a 200 ppm=mg/litro en el baño). El conservador recomendado es cal química o cal agrícola que contenga como mínimo un 90 % de hidróxido de calcio.
- **Recarga:** añadir 3.2 litro de producto y 12 kg del conservador por cada 1 000 litros de agua faltante. El pH debe ser siempre alcalino (12-14) para asegurar la estabilidad y efectividad ^{VII. 40}.



8.3 Anexo C: Calibración de material de vidrio

El material volumétrico de vidrio se calibró midiendo la masa del agua, tomando en cuenta su densidad y su temperatura, debido a que la densidad del agua varía con su temperatura, el agua empleada debe estar en equilibrio térmico con el ambiente en el que se encuentre.

La Tabla XI muestra la densidad del agua a diferentes temperaturas.

Tabla XI. Densidad del agua líquida entre 0 y 100 °C.

Presión externa: 1 atm = 101 325 Pa

Temperatura °C	Densidad kg / m ³	Temperatura °C	Densidad kg / m ³	Temperatura °C	Densidad kg / m ³
0 (hielo)	917,00	33	994,76	67	979,34
0	999,82	34	994,43	68	978,78
1	999,89	35	994,08	69	978,21
2	999,94	36	993,73	70	977,63
3	999,98	37	993,37	71	977,05
4	1000,00	38	993,00	72	976,47
5	1000,00	39	992,63	73	975,88
6	999,99	40	992,25	74	975,28
7	999,96	41	991,86	75	974,68
8	999,91	42	991,46	76	974,08
9	999,85	43	991,05	77	973,46
10	999,77	44	990,64	78	972,85
11	999,68	45	990,22	79	972,23
12	999,58	46	989,80	80	971,60
13	999,46	47	989,36	81	970,97
14	999,33	48	988,92	82	970,33
15	999,19	49	988,47	83	969,69
16	999,03	50	988,02	84	969,04
17	998,86	51	987,56	85	968,39
18	998,68	52	987,09	86	967,73
19	998,49	53	986,62	87	967,07
20	998,29	54	986,14	88	966,41
21	998,08	55	985,65	89	965,74
22	997,86	56	985,16	90	965,06
23	997,62	57	984,66	91	964,38
24	997,38	58	984,16	92	963,70
25	997,13	59	983,64	93	963,01
26	996,86	60	983,13	94	962,31
27	996,59	61	982,60	95	961,62
28	996,31	62	982,07	96	960,91
29	996,02	63	981,54	97	960,20
30	995,71	64	981,00	98	959,49
31	995,41	65	980,45	99	958,78
32	995,09	66	979,90	100	958,05

La calibración de los matraces aforados se llevó a cabo pesando primero el matraz aforado vacío y seco, después el matraz se llevó al aforo con



agua y se pesó, posteriormente se hizo la diferencia entre el matraz lleno y el vacío y se calculó el volumen con la siguiente fórmula:

$$d = m/V$$

V; Volumen, d; densidad y m; es la masa.

$$d = (\text{masa del matraz con agua} - \text{masa del matraz vacío}) / \text{volumen}$$

$$V = (\text{masa del matraz con agua} - \text{masa del matraz vacío}) / d.$$



8.4 Anexo D: La clasificación según Linneo para la garrapata

Según Linneo (antiguo biólogo sueco), cada organismo puede clasificarse utilizando el siguiente sistema: reino, filo, clase, orden, familia, género y especie. Este sistema evita que los animales, plantas, hongos, protozoos y algas, reciban varios nombres comunes en distintas partes del mundo. La solución a este problema radica en dar un nombre científico, formado por dos partes latinas, que normalmente se escriben en cursivas.

Reino: Animal

Filo: Artrópoda

Clase: Arácnida (arañas, cangrejos, escorpiones, garrapatas y ácaros)

Orden: Acarina (garrapatas y ácaros)

Familia: Ixodidae (garrapata dura) y Argasidae (garrapata blanda)

Géneros más comunes: Boophilus, Amblyomma, Anocentor, Dermacentor, Ixodes, Hyalomma, Rhipicephalus (garrapata dura) y Otobius, Ornithodoros (garrapata blanda).

Especies: microplus, cajennense, nitens, albipictus, sanguineus, etc.