

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS Y AMBIENTALES

TESIS DE GRADUACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

“MAGÍSTER EN MANEJO INTEGRAL DE LABORATORIOS DE  
DESARROLLO”

TEMA

**“EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL ACARICIDA  
AMITRAZ CON SOLVENTES DE BAJA TOXICIDAD PARA USO  
VETERINARIO.”**

AUTOR:

**PAULA CATALINA RECALDE CORONEL**

Guayaquil – Ecuador

Año

2015

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Anunziata y Filólogo por confiar siempre en mis decisiones;

A mi tía abuela, Graciela por incitarme a empezar y a terminar con este proyecto;

A mis hermanas, Cristina y Stephanie por ayudarme a mantener mis objetivos claros;

Y, a mi esposo, Danny Santamaría por todo su apoyo y comprensión a lo largo del camino.

A todos ustedes dedico este trabajo.

*Paulita*

## DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por los hechos y doctrinas expuestas en este tipo de Proyecto de Graduación, me corresponde exclusivamente; el patrimonio intelectual del mismo, corresponde exclusivamente a la **Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Departamento de Ciencias Químicas y Ambientales** de la Escuela Superior Politécnica del Litoral.



---

**Paula Catalina Recalde Coronel**

## TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



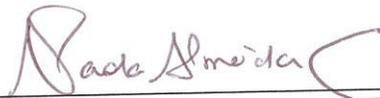
---

Olga González Sánchez Ph.D.  
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



---

Carola Resabala Z., M.Sc.  
DIRECTOR DE LA TESIS



---

Paola Almeida Guerra Ph.D.  
VOCAL DEL TRIBUNAL

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi primer agradecimiento a Dios, por llevarme de la mano en este largo recorrido, permitiéndome culminarlo exitosamente.

A Carola Resabala, M.Sc, Olga González, Ph.D., y Paola Almeida Ph.D., por sus aportes valiosos en la revisión de la tesis.

A Adrian Rivas, Ing. Qco. por su ayuda desinteresada. Y de manera muy especial a Luis Crippa, Lcdo. Qca., por su guía, apoyo, y sobre todo por las innumerables enseñanzas compartidas para lograr el desarrollo de este trabajo.

*Paulita*

# ÍNDICE GENERAL

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL .....	i
DEDICATORIA.....	2
AGRADECIMIENTOS .....	3
DECLARACIÓN EXPRESA .....	4
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN .....	5
ÍNDICE GENERAL.....	6
ÍNDICE DE TABLAS .....	8
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES .....	10
ABREVIATURAS .....	12
OBJETIVOS.....	13
INTRODUCCIÓN .....	14
CAPÍTULO I.....	17
1. INFORMACIÓN GENERAL.....	17
1.1 Generalidades. ....	17
1.1.1. Nomenclatura.....	17
1.1.2. Usos y espectro de acción. ....	18
1.1.3. Toxicidad del Amitraz.....	19
1.2 Hidrólisis del Amitraz.....	20
1.3 Estabilizantes del Amitraz.....	21
1.4 Amitraz en Formulaciones Veterinarias.....	22
1.5 Formulaciones de Productos Veterinarios.....	25
1.5.1. Concentrados Emulsionables y Microemulsionables. ....	25
1.5.2. Solventes en las Formulaciones. ....	27
1.5.3. Solventes Seleccionados y su Toxicidad .....	31
1.6 Legislación Nacional e Internacional. ....	35
1.7 Normativa Ambiental Ecuatoriana. ....	37
1.7.1. Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes.....	38
1.7.2. Norma de Calidad Ambiental del Recurso Suelo y Criterios de Remediación para Suelos Contaminados. ....	41

1.7.3. Sustancias Peligrosas.....	42
1.8 Técnicas Analíticas.....	46
1.8.1. Cromatografía.....	46
1.8.2. Colorimetría.....	49
CAPÍTULO II.....	54
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
2.1 Materiales.....	54
2.1.1. Materia Prima.....	54
2.1.2. Reactivos.....	55
2.1.3. Equipos.....	55
2.2 Métodos.....	57
2.2.1 Evaluación de diferentes solventes orgánicos de acuerdo al porcentaje de estabilizante utilizado en soluciones de Amitraz.....	58
2.2.2 Determinación Cualitativa de la Degradación del Amitraz En base a la Diferencia de color de las Soluciones.....	62
2.2.3 Determinación Cuantitativa del porcentaje de degradación de Amitraz por HPLC.....	64
2.2.4 Selección de Solventes más Estables que Contienen Amitraz.....	65
CAPÍTULO III.....	67
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
3.1 Resultados de la evaluación de la Solubilidad del Amitraz.....	67
3.2 Resultados de la Evaluación de la degradación del Amitraz con diferentes concentraciones de estabilizante.....	71
3.3 Resultados de la Determinación cualitativa de la degradación del Amitraz.....	78
3.4 Determinación cuantitativa de la degradación del Amitraz.....	82
3.5 Resultados de la Selección de los Solventes más Estables que Contienen Amitraz.....	86
CAPÍTULO IV.....	88
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	88
BIBLIOGRAFÍA.....	91
GLOSARIO.....	94
ANEXOS.....	96

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades Físico Químicas del Amitraz [5] .....	18
Tabla 2. Toxicidad aguda del amitraz en mamíferos [5].....	19
Tabla 3. Productos comerciales de Amitraz en el Ecuador [19]. .....	24
Tabla 4. Comparación de formulados Concentrados Emulsionables vs Concentrados Microemulsionables [23]. .....	26
Tabla 5. Propiedades de algunos solventes de uso común para las formulaciones de EC [24].....	29
Tabla 6. Contenido de Naftaleno de algunos solventes aromáticos [24].....	30
Tabla 7. Disolventes de éster metílico de aceite vegetal [24].....	30
Tabla 8. Ejemplos de solventes polares para usos en formulaciones [24]. .....	31
Tabla 9. Solventes, información toxicológica. (Fuente: MSDS solventes) .....	32
Tabla 10. Criterios de Calidad de Fuentes de Agua para Consumo Humano Y Doméstico. Requieren tratamiento Convencional (Compendio tomado de la Tabla 1 del Anexo 1 del Libro VI del TULSMA).....	38
Tabla 11. Criterios de Calidad de Fuentes de Agua para Consumo Humano Y Doméstico y que para su potabilización solo requieren desinfección (Compendio tomado de la Tabla 2 del Anexo 1 del Libro VI del TULSMA).....	39
Tabla 12. Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce (Compendio tomado de la Tabla 10 del Anexo 1 del Libro VI del TULSMA). .....	39
Tabla 13. Límites de descarga a un cuerpo de agua marina (Compendio tomado de la Tabla 11 del Anexo 1 del Libro VI del TULSMA). .....	39
Tabla 14. Parámetros de Monitoreo de las Descargas Industriales (Compendio tomado de la Tabla 12 del Anexo 1 del Libro VI del TULSMA). .....	40
Tabla 15. Criterios de Calidad del Suelo (Compendio tomado de la Tabla 1 del Anexo 2 del Libro VI del TULSMA). .....	41
Tabla 16. Criterios de Remediación (Valores máximos permitidos), (Compendio tomado de la Tabla 2 del Anexo 2 del Libro VI del TULSMA).....	41
Tabla 17. Desechos Peligrosos por Fuente Específica (Compendio tomado del Listado 1 del Anexo B del Acuerdo Ministerial 142). .....	43
Tabla 18. Listado de Desechos Peligroso por fuente no específica (Compendio tomado del Listado 2 del Anexo B del Acuerdo Ministerial 142). .....	45
Tabla 19. Datos de las propiedades físicas de los solventes. (Fuente: MSDS cada compuesto).....	59
Tabla 20. Solución concentrada de Amitraz. (Fuente: Autor).....	59
Tabla 21. Codificación de concentrados de Amitraz. (Fuente: Autor) .....	61
Tabla 22. Observaciones de la disolución de activo. (Fuente: Autor) .....	67
Tabla 23. Mezclas con menores tiempos de disolución. (Fuente: Autor) .....	69
Tabla 24. Resultados de evaluación de las soluciones a temperatura ambiente. (Fuente: Autor) .....	72
Tabla 25. Soluciones que no forman cristales (25+/- 0.1) °C. (Fuente: Autor) .	73

Tabla 26. Resultados de Estabilidad a (0+/-1)°C. Cipac MT39.3VOL J. (Fuente: Autor) .....	75
Tabla 27. Mejores resultados de la prueba de Estabilidad a (0+/-1)°C. (Fuente: Autor) .....	77
Tabla 28. Resultados de Estabilidad a (54+/-1)°C.(Fuente: Autor) .....	78
Tabla 29. Resultados ΔE Color Muestras a Temperatura ambiente vs Muestras envejecidas 14 días a (54+/-1)°C (Fuente: Autor).....	79
Tabla 30. Porcentaje de degradación de las muestras a Temperatura ambiente vs Muestras envejecidas 14 días a (54+/-1)°C (Fuente: Autor).....	82

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Estructura molecular del activo Amitraz.[5].....	17
Ilustración 2. Representación de los productos de degradación del Amitraz [12]. .....	21
Ilustración 3. Esquema de un equipo HPLC. [27].....	46
Ilustración 4. Elusión por gradiente [27]. ....	48
Ilustración 5. Elusión Isocrática [27]. ....	48
Ilustración 6. Tonalidad [28] .....	50
Ilustración 7. Saturación [28]. ....	50
Ilustración 8. Luminosidad [28]. ....	51
Ilustración 9. Curva espectral de una muestra medida [28]. ....	52
Ilustración 10. Incubadora (Marca GEMMY CO. Modelo IN-010) (Fuente: Autor). ....	55
Ilustración 11. Agitador magnético con calentamiento (Marca Thomas Scientific, Modelo n/d) (Fuente: Autor). ....	55
Ilustración 12. Incubadora (Marca GEMMY CO. Modelo IN-010) (Fuente: Autor). ....	56
Ilustración 13. Enfriador (Marca Polyscience, Serie 009500271) (Fuente: Autor). .....	56
Ilustración 14. Colorímetro Lovibond LC 100, Modelo RM200 (Fuente: Autor). 56	
Ilustración 15. Cromatógrafo de líquidos, marca Agilen Technologie con detector DAD (Fuente: Autor).....	57
Ilustración 16. Soluciones concentradas de Amitraz. (Fuente: Autor).....	71
Ilustración 17 Ejemplo de muestras que cristalizaron a temperatura ambiente (Fuente: Autor). ....	74
Ilustración 18. Cambio de coloración de los concentrados (Fuente: Autor). ....	79

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Comportamiento del Amitraz durante la disolución en distintos solventes. (Fuente: Autor).....	70
Gráfica 2. Presencia de cristales luego de 7 días a (0+/-1)°C. (Fuente: Autor)	76
Gráfica 3. Gráfica de Color vs %p/v carbodiimida (Fuente: Autor).....	81
Gráfica 4. Degradación del amitraz vs solvente utilizado (Fuente: Autor).....	84
Gráfica 5. Comparación resultados Degradación Amitraz y Color (54+/-1)°C. (Fuente: Autor) .....	85

## ABREVIATURAS

%p/p	Porcentaje masa soluto/ masa de solución
%p/v	Porcentaje peso por cada unida de volumen
n/d	No definido o identificado.
$\Delta E$	Cambio de color entre la muestra inicial y la muestra final
°C	Grado centígrado
APVMA	Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority
CAS	Identificación numérica única asignada en la base de datos del Chemical Abstract Service (CAS) de la Sociedad Americana de Química. Identificación única de producto.
CFR	Código de regulaciones federales del gobierno de los Estados Unidos de América
CIPAC	Collaborative International Pesticides Analytical Council
EC	Concentrado emulsionable
EC 50	Máxima concentración eficaz media
FAO	Food and Agricultural Organization
GC	Cromatografía gaseosa
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IUPA	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.
LC50	Concentración letal media
LD50	Dosis letal media
MAGAP	Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
ME	Concentrado micromeulsionable
MERCOSUR	Mercado común del Sur
MSDS	Material Safety Data Sheet (Ficha de Datos de Seguridad).
NOEL	Nivel sin efecto adverso observable
OIE	Oficina Internacional de Epizootias
OMS	Organización Mundial de la Salud
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
RP	Código de registro de producto, EPA
T. M	Toneladas métricas
T	Tiempo
USP	U.S. Phamacopeial Convention
VOC	Compuesto orgánicos volátiles

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la degradación del activo Amitraz en una matriz que contenga solventes biodegradables o de baja toxicidad, que sirva de partida para la obtención de un concentrado microemulsionable.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar diferentes solventes orgánicos de acuerdo al porcentaje de estabilizante utilizado en soluciones que contienen Amitraz.
- Determinar la degradación del Amitraz por la diferencia de color en las soluciones.
- Determinar el porcentaje de degradación del Amitraz por HPLC.
- Seleccionar las soluciones más estables de Amitraz.

# INTRODUCCIÓN

La actividad ganadera, principalmente la lechera, por su situación geográfica privilegiada, es la actividad económica de mayor importancia del sector agropecuario en el Ecuador, a tal punto que los ganaderos exhiben como insignia el hecho de que el país ahorra 500 millones USD\$ anuales al no tener que importar el producto. Según datos recogidos en el Censo Agropecuario del año 2000 se registraron 4.486.020 cabezas de ganado vacuno, de los cuales 51% se encuentran en la región sierra, 36% en la región costa y un 13% en el resto del país [1]. En lo que refiere al manejo y cuidado del ganado vacuno, 29.197 cabezas de ganado reciben desparasitación externa [1].

El sector da trabajo directo a más de 1.500.000 ecuatorianos y su producción nacional es de 3.525.027 litros diarios, para el consumo nacional [2]. Además se registró el faenamiento de 848.172 reses, lo que representa una tasa de extracción de 18%, una producción de carne de 152.671 T.M. y un consumo per cápita aproximado de 12.72 Kg. por persona /año [2].

El control de garrapatas y ácaros es una actividad fundamental en el sector ganadero de cualquier país, puesto que causa pérdidas económicas a nivel nacional. Se obtuvo un estimado de presencia de garrapatas en la Sierra del 42,7 %, en el oriente 32,2 % y en la costa el 25,1 % [3].

Para el control fitosanitario de las garrapatas y ácaros, los ganaderos emplean principalmente métodos de control basados en el uso de acaricidas e insecticidas entre ellos se emplean productos que contienen el activo Amitraz ya sea solo o acompañado con piretroides, carbamatos, entre otros.

Las formulaciones que se expenden en el mercado usualmente son tipo EC (concentrado emulsionable) las cuales tienen concentraciones que van desde 30 g.L<sup>-1</sup>, para animales domésticos, hasta 210 g.L<sup>-1</sup> para animales de granja.

Por tal motivo, en este estudio se observará el empleo de una solución concentrada de amitraz (33% p/v) y sus análisis se realizarán como si se estuviese analizando un concentrado emulsionable o un concentrado microemulsionable.

Estas formulaciones contienen usualmente más del 50% de solvente. El tipo de solvente usado en cada formulado influye en la toxicidad final del producto. Para el realizar el desarrollo de un nuevo producto es importante evaluar la toxicidad de los aditivos y excipientes. Es por ello que, actualmente, los fabricantes, están orientados a elaborar nuevas formulaciones a base de materiales naturales, tales como aceites vegetales y azúcares con el fin de reemplazar los solventes comunes o alejarse del uso de disolventes, cuando sea posible, para eliminar los compuestos orgánicos volátiles (VOC), aumentar la seguridad de los productos, mantener o mejorar la calidad del producto y disminuir el tiempo que toma registrar una nueva formulación.



# CAPÍTULO I

## 1. INFORMACIÓN GENERAL

### 1.1 Generalidades.

El Amitraz es un compuesto triazapentadieno, que es un miembro de la familia de los plaguicidas derivados de formamida.[4].

#### 1.1.1. Nomenclatura.

Nombre Común Amitraz (BSI, EISO, ANSI, ESA, BAN, JMAF); amitraze (m)(F-ISO).

Nomenclatura IUPAC: N-metilbis (2,4-xililiminometil) amina.

Nombre químico Abstract: N'-(2,4-dimetilfenil)-N-[(2,4-dimetilfenil)imina]metil];- =N-metilmetanimidamida.

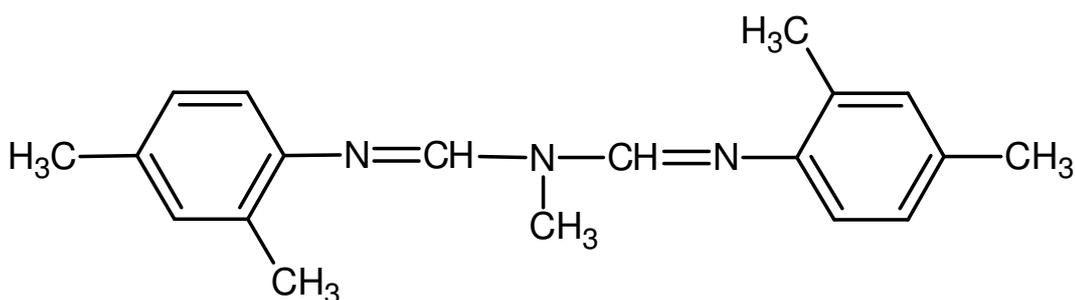
Otros nombres: N,N-bis(2,4-xililiminometil) metilamina;

N-metil-N'-2,4-xilyl -N- (N-2,4-xililformimidoyl) formamida;

1,5-di-(2,4-dimetilfenil)-3-metil-1,3,5-triazapenta-1,4-dieno.

CAS No. 33089-61-1.

Fórmula Molecular  $C_{19}H_{23}N_3$  [5].



**Ilustración 1.** Estructura molecular del activo Amitraz.[5]

**Tabla 1.** Propiedades Físico Químicas del Amitraz [5]

<b>Forma</b>	Forma cristalina como agujas sin color o ligeramente amarillentas
<b>Peso Molecular</b>	293.4
<b>Punto de Fusión</b>	86 -88 °C
<b>Presión de Vapor</b>	0.034 mPa
<b>Kow log P</b>	5.5
<b>Constante de Henry</b>	1 Pa*m <sup>3</sup> .mol <sup>-1</sup>
<b>Pka</b>	4.2 (base débil)
<b>Gravedad Específica</b>	1.128 (20°C)
<b>Solubilidad</b>	Agua: < 0.1mg.L <sup>-1</sup> (20°C) Soluble en solventes orgánicos, Soluble en acetona, tolueno, xileno >300g.L-1 .
<b>Estabilidad</b>	Hidrólisis: DT 50 (25°C, pH 5) 2.1h, DT 50 (25°C, pH 7) 22.1h, DT 50 (25°C, pH 9) 25.5h. Luz solar, parece tener pocos efectos sobre la estabilidad.

### 1.1.2. Usos y espectro de acción.

Las formamidinas exhiben alta actividad acaricida, frente a las garrapatas en el campo de la veterinaria y los ácaros en general en el campo de la horticultura, causantes de las mayores pérdidas económicas en la mayor parte del mundo.

Entre los acaricidas que han llegado a ser de uso común se incluyen:

- a) Para el control de las garrapatas del ganado:
  - compuestos arsenicales (arsenito sódico)
  - compuestos organofosforados (clorpirifos, coumafos, diazinon)
  - carbamatos (carbaril)
  
- b) Para el control de ácaros fitófagos:
  - arilos con puente sulfuro (clorobenzida, tatradijon, tetrazul)
  - compuestos organoclorados

- compuestos organofosforados
- carbamatos
- amidinas (clorodimeformo, formentanato)
- derivados del dinitropentol (binapacril, dinobuton, DNOC)
- otros ( cihexatin, propargite, quinometionato)

Un amplio rango de compuestos de diferentes estructuras químicas han sido usados para el control de ácaros. Las resistencias de ácaros a sustancias químicas se han desarrollado con rapidez y se han identificado casos de resistencia a diversas sustancias, lo que ha llevado a la introducción del uso del amitraz [6].

El amitraz es un insecticida/acaricida usado para controlar la *Psylla pyri*, garrapatas del ganado y del perro, piojos, y ácaros de la sarna [7]. En la práctica agrícola, el objetivo del amitraz serían los ácaros fitófagos, y en ganadería las garrapatas. Además, el amitraz presenta también actividad en un grupo de insectos de importancia económica, tal como los Lepidópteros y algunos Hemípteros, sin embargo, su uso está restringido en caballos, debido a que provoca una patología conocida como íleo paralítico [8].

### 1.1.3. Toxicidad del Amitraz.

Se han realizado estudios de toxicidad aguda en mamíferos y se han administrado por vía oral, dérmica e inhalatoria. En la Tabla 2 se indican los valores de LD<sub>50</sub> y LC<sub>50</sub> para el amitraz.

**Tabla 2. Toxicidad aguda del amitraz en mamíferos [5]**

<b>Especie</b>	<b>Oral (mg/kg) LD50</b>	<b>Ojos y Piel (mg/kg) LD50</b>	<b>Inhalatorio (mg.L-1 ) (6h) LC50</b>
<b>Ratas</b>	650	>1600	65
<b>Ratones</b>	>1600	-	-
<b>Conejos</b>	-	>200	-

En ensayos de administración oral de amitraz en la dieta diaria en ratas y perros, no se observaron efectos adversos, en un periodo de 2 años. La dosis administrada en ratas fue de 50 a 200 ppm y en perros de  $0.25 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ . La dosis de NOEL para humanos es  $0.125 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  diario. [5].

El Amitraz no es irritante para los ojos y la piel, es moderadamente tóxico por vía dermal, no inhibe la colinesterasa. Es ligeramente tóxico por vía oral y por inhalación. El amitraz, se metaboliza rápidamente en varias especies, incluyendo los seres humanos, para formar seis metabolitos que se excretan principalmente en la orina. EPA tiene establecido una dosis de referencia de amitraz a  $0.0025 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$  en base en los resultados del estudio de toxicidad oral crónica en perros. [11]

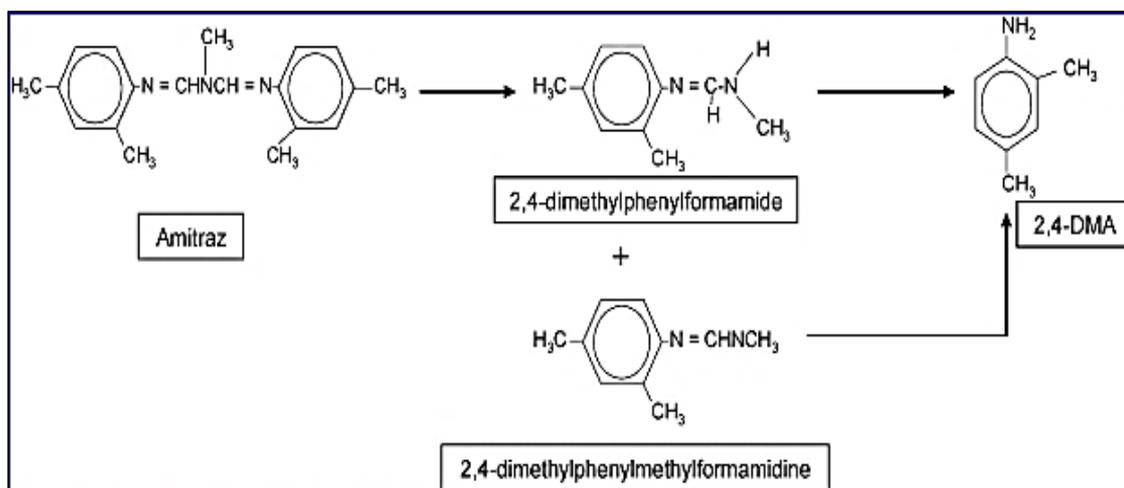
Por lo antes descrito la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado al amitraz en categoría III y la EPA (United States Environmental Protection Agency) lo ha clasificado en formulaciones con categoría III. [5]

El amitraz también presenta toxicidad en otros vertebrados. El valor de la  $\text{LC}_{50}$  (96h) para peces está en un rango de 1 a 10 ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), para aves (codornices y patos) presentan una  $\text{DL}_{50}$  de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  en la dieta [7]. La toxicidad del activo para otros insectos es bastante baja, y en general, insectos beneficiosos como los predadores, parásitos, y polinizadores no son severamente afectados bajo condiciones normales de uso [9]. Así las arañas predadoras parecen ser relativamente insensibles, aunque los ácaros predadores son claramente sensibles [10].

## **1.2 Hidrólisis del Amitraz.**

El Amitraz se hidroliza tanto en condiciones químicas como biológicas. Se ha demostrado que la luz solar y la temperatura también afectan al activo. Factores adicionales como el medio en el que se encuentra disuelto, el pH, y la fuerza iónica afectan la estabilidad del activo [12].

Se ha demostrado que el principal producto mayoritario en la degradación del amitraz es la 2,4-dimetilanilina (2,4-DMA), CAS 95-68-1, proveniente de dos principales productos intermedios: N-(2,4-dimetilfenil)-N-metilformamidina (DPMF) y 2,4-dimetilfenilformamida (DMF) (Ilustración 2). Los productos han sido detectados en estudios diversos y los métodos empleados han sido HPLC – masas, GC -masas, métodos electroquímicos, entre otros [12].



**Ilustración 2.** Representación de los productos de degradación del Amitraz [12].

La hidrólisis del amitraz ha sido evaluada en medios acuosos y orgánicos. Productos como agua, soluciones acuosas con etanol, propilenglicol, lauril sulfato de sodio, bromuro de cetrimonio, polysorbato 80, soluciones de buffers a distintos pH (3 a 10), solventes orgánicos como dimetil sulfóxido, etanol, propilenglicol, hexano, acetonitrilo han sido usados como matrices para evaluar los efectos sobre la estabilidad del amitraz [12-13].

Estos estudios muestran que la hidrólisis del amitraz, depende de la constante dieléctrica del medio en el que está disuelto, es más rápida en condición ácida y más lenta en condiciones neutras o alcalinas, incrementa con un aumento de temperatura [13] y que, el Amitraz es más estable en acetonitrilo y dimetilsulfóxido [12].

### 1.3 Estabilizantes del Amitraz.

El Amitraz se degrada en presencia de agua y de residuos ácidos [12-13]. Con el fin de buscar una solución a la inestabilidad del Amitraz en diferentes matrices, investigadores vieron la necesidad de encontrar algún aditivo que permitiera inhibir la degradación del compuesto.

Para retardar la descomposición del Amitraz se han empleado con éxito, tamices moleculares y carbodiimidas, y existen referencias en las que haciendo combinaciones específicas de carbodiimidas, solventes, co- solvente y tensoactivos se ha logrado encontrar alguna mezcla que favorezca a la estabilidad del Amitraz e formulaciones comerciales.

Mezclas experimentales preparadas conteniendo varios ratios de solvente (N octil pirrolidona), surfactante (aceite de castor etoxilado) y un estabilizante (Stabaxol I o tamiz molecular), han permitido obtener concentrados estables. Además, se ha determinado que el uso de estabilizante entre un 5%p/v a 20%p/v evita la degradación del activo [15]. Estudios posteriores han mostrado que empleando el estabilizante stabaxol I no solo retardaba la degradación del activo en el formulado sino también en las soluciones acuosas donde el concentrado es disuelto para aplicación [14].

## **1.4 Amitraz en Formulaciones Veterinarias.**

El Amitraz es uno de los acaricidas-insecticidas que se expenden en el mercado y se utiliza principalmente como un acaricida para el control de garrapatas, sarna (ácaros) tanto en bovino, ovinos y en animales domésticos (perros).

Las fichas técnicas de marcas comerciales de antiparasitarios con amitraz más extendidas para uso en la ganadería ecuatoriana son las formulaciones como concentrados emulsionables para baños de inmersión o aspersion (amitraz al 12,5% p/v y amitraz a 20% p/v)

El amitraz tiene un mecanismo de acción diferente que los organofosforados, carbamatos, piretroides y endectocidas, pues no tiene resistencia cruzada con otras químicas empleadas en la ganadería. Es un

producto de uso externo. Puede aplicarse por medio de baños de aspersión, baños de inmersión y por aplicación tópica en lesiones localizadas para el control de la demodicosis canina y para controlar la sarna. El amitraz, no está aprobado para utilizar en gatos ni caballos [16].

En las zonas ganaderas hay poblaciones de garrapatas como las *Boophilus* resistentes al amitraz, sobre todo en Australia. Con el aumento general de la resistencia de las garrapatas a los piretroides, el uso del amitraz ha aumentado, y con el uso crece también el número de casos reportados de resistencia de garrapatas al amitraz. [17]

Históricamente se ha considerado a la garrapata como una plaga de climas cálidos y medios. Este tipo de ectoparásito se reproduce con mayor facilidad en época de humedad alta y calor. En nuestro país se han identificado 77 especies de garrapatas pertenecientes a 5 géneros de la familia Argasidae y 7 a la familia ixodidae.

No se ha realizado investigaciones sobre la prevalencia de las garrapatas en el Ecuador, por la velocidad de diseminación de este ectoparásito en las épocas en que más frecuentemente se presentan, es decir en condiciones bioclimáticas. Pero si se han descrito sobre las enfermedades que producen las garrapatas en distintos países de América así como también en Europa.

Pese a que no existen estudios de prevalencia en el Ecuador, hay un mayor porcentaje de presencia de garrapatas en las regiones tropicales y subtropicales, siendo mayores en la costa y oriente ecuatoriano. Los predios identificados en su mayoría como afectados por este ectoparásito, corresponden a explotaciones mixtas de carne y leche [18].

Según la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (Agrocalidad), los productos vigentes para su comercialización y que contienen el activo Amitraz son los siguientes [19]:

**Tabla 3. Productos comerciales de Amitraz en el Ecuador [19].**

Nombre Comercial	Concentración Amitraz g·L <sup>-1</sup>	Tipo de Formulación	Empresa que los distribuye	Especies	Dosis mL·L <sup>-1</sup>	Solvente Reportado en MSDS
Acarex	208	EC*	Lab. Industriales Framacéuticos Ecuatorianos (LIFE)	Bovinos, ovinos.	1ml/L	No disponible
Amitraz al 20.8%	208	EC*	Indufar	Bovinos, ovinos, caprino.	1ml/L	No disponible
Amitraz 20.8%	208	EC*	Lavetec Cia. Ltda.	Bovinos, ovinos, caprino.	1ml/L	No disponible
Aspercín 20.8% MK	208	EC*	Tecnoquímicas del Ecuador	Bovinos, ovinos, caprino,	1ml/L	No disponible
Fulminad o 20.8% Amitraz	208	EC*	Lab. Chalver	Bovinos Caninos	1ml/L	No disponible
	210	EC*	CC Laboratorios Pharmavital CIA. Ltda.	Bovinos	1ml/L	No disponible
Ectotraz 12.5%	125	EC*	Laquinsa Andina S.A	Bovinos	1.65ml/L	No disponible
Amitraz 12.5% Erma	125	EC*	Agroalimentar Cia. Ltda.	Bovinos	1.65ml/L	Solvente aromático: solvesso 150
Amitraz	125	EC*	Inpel	Bovinos	1.65ml/L	No disponible
Bovitraz	125	EC*	Ecuquímica (Bayer)	Bovinos	1.65ml/L	Aromático, nafta petróleo >60%
Anikil	125	EC*	Biolovent C.A.	Bovinos, ovinos, caprino, caninos.	2ml/L	No disponible
Tactic	125	EC*	Intervet Ecuador S.A.	Bovinos, ovinos, caprino.	1.65ml/L	No disponible
Amitraz 12.5%	125	EC*	Sinternac S.A.	Bovinos, ovinos, caprino, caninos.	1.66ml/L	No disponible
Bañol EC	125	EC*	Agroganadero Colombo Ecuatoriano S.A.	Bovinos, ovinos, caninos.	1.65ml/L	No disponible
Amitraz Pet	30	EC*	GEN-FAR	Caninos	12.5ml/L	No disponible

\*EC: Concentrado Emulsionable.

En la tabla 3, se muestran los datos disponibles al público sobre los productos que se comercializan en el país. La información hallada sobre la composición de cada formulado es escasa.

## **1.5 Formulaciones de Productos Veterinarios.**

Los productos veterinarios pueden ser productos de origen biológico o farmacéutico y pueden elaborarse de distintas formas según la necesidad del mercado. Existen distintos tipos de formulaciones, como por ejemplo, concentrados emulsionables (EC), concentrados microemulsionables (ME), emulsiones aceite en agua (EW), polvos mojables (WP), polvos dispersables, entre otros [22].

Una formulación es una mezcla de sustancias entre ellas: ingrediente activo, aditivos y excipientes. A breves rasgos, un ingrediente activo es el que ejerce la acción biológico o farmacéutica sobre la plaga o enfermedad; los aditivos y excipientes son sustancias de distinto origen con las que se mezclan los ingredientes activos para preparar una mezcla estable, estas sustancias pueden ser, tensoactivos, solventes, estabilizantes , productos inertes, entre otros [31].

### **1.5.1. Concentrados Emulsionables y Microemulsionables.**

Los formulados que emplean mayor porcentaje de solvente son los concentrados emulsionables (EC) y los concentrados microemulsionables (ME). Ambas formulaciones se caracterizan por ser una mezcla equilibrada de aceite (solventes), activo y tensoactivos que permitan la emulsión espontánea al ser diluidos en agua. La diferencia principal, entre ambas formulaciones, es el tamaño de la gota que tienen sus emulsiones. Así mismo, cada formulación tiene sus ventajas y desventajas al momento de ser elaboradas.

**Tabla 4.** Comparación de formulados Concentrados Emulsionables vs Concentrados Microemulsionables [23].

	<b>Concentrados Emulsionables (EC)</b>	<b>Microemulsiones (ME)</b>
Ingredientes	Formado por aceite (solvente), activo, tensoactivo.	
Emulsiones formadas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tamaños de gotas a formar: 0.1um a 10um.</li> <li>• Forma emulsiones lechosas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tamaños de gotas a formar: menor a 0.1um.</li> <li>• Forma Emulsiones Traslúcidas, ligeramente azuladas.</li> </ul>
Beneficios	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Facilidad de manipulación, transporte y almacenamiento.</li> <li>• Facilidad en la preparación: emulsificación con poca agitación</li> <li>• Eficacia biológica relativamente alta.</li> <li>• Costo de fabricación relativamente bajo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fácil de transportar y almacenar.</li> <li>• Termodinámicamente estable</li> <li>• Bajo contenido de solvente</li> <li>• Alto punto de inflamabilidad y manipulación segura.</li> <li>• Mejora de bioeficacia.</li> </ul>
Limitaciones	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Altas concentraciones de solventes que pueden otorgar mayor toxicidad a la formulación.</li> <li>• El bajo punto de inflamación de algunos Solventes.</li> <li>• Solubilidad del principio activo en Solvente.</li> <li>• Uso de solventes miscibles en agua, causando problemas de cristalización del activo en la dilución.</li> <li>• La estabilidad de la emulsión puede verse afectada por electrolitos, dureza del agua, índice de dilución y temperatura.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bajo contenido de principio activo</li> <li>• Estabilidad en la dilución</li> </ul>

Un tema importante a considerar en estas la formulación de productos veterinarios es la toxicidad que pueden tener algunos de los aditivos y excipientes, es por ello, que la tendencia actual de las compañías es desarrollar formulaciones con aditivos y excipientes a base de materias primas menos nocivas en beneficio del usuario y del medio ambiente [23-24].

Sin embargo, aún encontramos patentes disponibles donde se sugiere el uso de compuestos aromáticos, ciclohexanona, metyl pirrolodiona (Patente EP 0226285 A1, 1987-06-24), xileno (ES 2116193 B1, 1999-07-01) para elaborar formulados.

## 1.5.2. Solventes en las Formulaciones.

Los solventes son componentes clave de las formulaciones de plaguicidas líquidos y una amplia gama es utilizada dependiendo de las características de solubilidad del ingrediente activo. El agua es el disolvente más simple y seguro, pero muchos plaguicidas tienen muy baja solubilidad en agua. Sin embargo, a menudo son suficientemente solubles en disolventes orgánicos polares y no polares, especialmente en bases de petróleo y disolventes aromáticos. [24].

Los requisitos generales de los disolventes usados en formulaciones son los siguientes:

- Buena solvencia para los ingredientes activos
- Baja toxicidad
- Baja inflamabilidad
- Compatible con equipos de proceso y aplicación
- Compatible con paquetes de formulación
- Bajo costo

Actualmente algunos disolventes principales, frecuentemente utilizados en formulaciones están dando toxicidad y preocupaciones ambientales y se están buscando alternativas más seguras. En reemplazo de algunos de estos disolventes se están realizando cambios a disolventes “verdes” tales como aceites vegetales, derivados de ésteres de triglicéridos y de ácidos carboxílicos como un sustituto de solventes a base de petróleo.

Los aceites parafínicos alifáticos tales como queroseno tienen muy baja solubilidad en agua y baja toxicidad. Desafortunadamente tienen un pobre poder disolvente para la mayoría de los ingredientes activos por lo que no se utilizan normalmente como disolventes principales para las formulaciones de EC y ME. Un hidrocarburo aromático inmiscible en agua tal como xileno ha sido históricamente el disolvente preferido y todavía se utiliza en algunos países en desarrollo, en particular China. Sin embargo, debido a su bajo punto de inflamación, está siendo eliminado y reemplazado por solventes con mayor punto de inflamación especialmente el C9 y C10 aromático "Solvesso" 150 y

200 de proveedores como ExxonMobil.

Las formulaciones de EC y ME requieren a veces co-disolventes para aumentar la solubilidad del ingrediente activo y disolventes polares más potentes tales como cetonas que se utilizan para este propósito. Sin embargo, pueden ser reactivos, causando la descomposición del ingrediente activo y también tienen un poco de solubilidad en agua, lo que puede afectar negativamente las propiedades de dilución en agua. Algunas de las cetonas utilizadas tradicionalmente tienen problemas de toxicidad. Ejemplos son la isoforona, que ahora está en la lista de la EPA 1 ("ingredientes inertes de preocupación toxicológica") y N-metil pirrolidona (NMP), cuya clasificación ha sido revisada por la Dirección de Sustancias Peligrosas de la UE. NMP ahora incluye frases de riesgo de la piel, irritación de ojos y vías respiratorias, la posibilidad de daño de los fetos y posibles riesgos de perjudicar la fertilidad. [24].

Los siguientes son algunos co-disolventes utilizados en formulaciones de EC (concentrados emulsionables), ME (microemulsiones):

#### **Cetonas**

- Ciclohexanona
- Metil Ciclohexanona
- Acetofenona
- Dialquilcetonas

#### **Alcoholes**

- N-butanol – a veces utilizada para aumentar la solubilidad de los ingredientes activos en disolventes a base de petróleo
- Alcoholes C8-C18
- Ciclohexanol

#### **Éteres alifáticos**

Estos son solventes polares con baja fitotoxicidad y se utilizan como co-disolventes aunque algunos presentan toxicidad y problemas ambientales. Se muestran los siguientes ejemplos:

- Dietilenglicol y sus éteres.
- Dipropilenglicol y sus éteres.
- Propilenglicol y sus éteres.

- Polietilenglicol (PEG 200/400)

Los datos sobre la solubilidad en agua, punto de inflamación y el punto de ebullición para algunos disolventes y co-disolventes comúnmente usados en formulaciones de EC se muestran en la Tabla 5 [24].

**Tabla 5.** Propiedades de algunos solventes de uso común para las formulaciones de EC [24].

Clase	Disolvente	Solubilidad en agua g/kg	Punto de inflamación ° C	Punto de ebullición ° C
<b>Hidrocarburos</b>	Xileno	insoluble	25	140
	Queroseno	insoluble	72	222
	Isopar L (Exxon)	insoluble	70	194
	Solvesso 100 (Exxon)	insoluble	49	168
	Solvesso 150(Exxon)	insoluble	65	196
	Solvesso 200(Exxon)	insoluble	104	249
<b>Cetonas</b>	ciclohexanona	50	43	156
	metil ciclohexanona	25	53	168
	isoforona	12	96	212
	N-metil pirrolidona	miscible	95	202
<b>Alcoholes</b>	N-butanol	78	29	117
<b>Éteres</b>	diethoxol	miscible	96	200

Se ha introducido, comercialmente, solventes basados en pirrolidonas con un amplio rango de puntos de inflamación. Los más populares son: N-metil 2 pirrolidona, N-octilpirrolidona y N-dodecilpirrolidona. Sin embargo, hay algunas preocupaciones sobre la N-metil-pirrolidona que están siendo investigadas.

Los solventes con base de petróleo también han causado preocupaciones sobre toxicidad y problemas ambientales, principalmente debido a su contenido de naftaleno. Los naftalenos son posibles carcinógenos, por esta razón algunos solventes aromáticos están siendo reemplazados por productos con bajo contenido de naftaleno. En la Tabla 6 se enlistan algunos de los productos que se comercializan y sus características.

**Tabla 6.** Contenido de Naftaleno de algunos solventes aromáticos [24].

<b>Solvente Aromático</b>	<b>Punto de inflamación ° C</b>	<b>Contenido de Naftaleno (%)</b>	<b>Vendedor</b>
<b>Solvesso 150</b>	65	8-12	ExxonMobil
<b>Solvesso 200</b>	104	8-12	ExxonMobil
<b>Solvesso 150ND</b>	63	<1	ExxonMobil
<b>Solvesso 200ND</b>	107	<1	ExxonMobil
<b>Caromax 20</b>	66	4.4	Petrochem Carless
<b>Caromax 28</b>	106	2.1	Petrochem Carless
<b>Caromax 20LN</b>	66	0.9	Petrochem Carless
<b>Caromax 28LN</b>	106	0.7	Petrochem Carless
<b>Caromax 20 XLN</b>	66	0.08	Petrochem Carless
<b>Caromax 28 XLN</b>	106	0.08	Petrochem Carless

Con el fin de reemplazar completamente los solventes aromáticos se están investigando alternativas como los ésteres de metilo de aceites vegetales. El problema con estos solventes radica en su poder de solvencia que es mucho menor que la de los aromáticos. Otro inconveniente que presentan es su tendencia a solidificarse a bajas temperaturas por lo que en esos casos es necesario usar anticongelantes y anticristalizantes. En la siguiente tabla se muestran algunos de los productos de origen vegetal que se comercializan.

**Tabla 7.** Disolventes de éster metílico de aceite vegetal [24].

<b>Nombre Comercial</b>	<b>Composición</b>	<b>Punto de Congelamiento</b>	<b>Proveedor</b>
Agnique ME18 RD-F	Mezcla C181,11,111*	-10	Cognis
Agnique ME18 RD-F	Mezcla C181,11,111*	-	Cognis
Agnique ME18 RD-F	C12/C14 coco	-8	Cognis
Agnique ME18 RD-F	C12/C14	-1	Cognis
Stepsol ME	Oleato de metilo/linoleato	-5	Stepan
Stepsol ROE-W	Ester de metilo del aceite de canola	-	Stepan

\*C181, tiene un enlace doble carbono- carbono (ácido oleico). C1811, tiene 2 enlaces dobles carbono – carbono (ácido linoleico). C18111, tiene 3 enlaces carbono-carbono (ácido linolénico).

Cuando la solubilidad del activo es un problema, habitualmente, se emplean disolventes polares miscibles en agua como co-solventes en concentrados emulsionables (EC). El activo disuelto no debe cristalizar ni en el formulado ni en la solución acuosa donde se disuelva para aplicación.

Algunos ejemplos de solventes polares se muestran en la tabla siguiente:

**Tabla 8.** Ejemplos de solventes polares para usos en formulaciones [24].

<b>Solvente</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Comentarios</b>
N-metil pirrolidona	ISP	Está siendo reemplazado por alternativas más seguras.
γ-Butirolactona	ISP	
Éteres de Etilenglicol	Dow	Serie Dowanol, cellsolve, carbitol.
Éteres de propilenglicol	Lyondell	Serie Arcosolv P
Lactatos / etil lactatos	Purac	Serie Purasolv
Ésteres metílicos de ácidos dicarboxílicos	Rhodia	Serie Rhodiasolv RPDE
Propilen carbonato	Hunstman	Serie Jeffsol
Alcohol Tetrahidrofurfuril	Chemtura	-

### 1.5.3. Solventes Seleccionados y su Toxicidad

Durante la elaboración de éste trabajo, se emplean los solventes enlistados en la tabla 9, en base a la información mencionada en la sección 5.1.2.

Se escogieron solventes orgánicos recomendados para uso en formulaciones veterinarias y agroquímicas, con un bajo perfil de toxicidad, así como, solventes convencionales de mayor cuidado como tolueno, ciclohexanona y solvesso 150 disponibles en el laboratorio.

En la tabla 9 se indican los valores de toxicidad de cada uno de los solventes tomados de la ficha de datos de seguridad (MSDS) de cada producto.

**Tabla 9.** Solventes, información toxicológica. (Fuente: MSDS solventes)

No.	Nombre Comercial	Nombre Químico	TLV/TWA (mg/m3)	Oral mg/kg (LD50) RATA	Dermal mg/kg (LD50) CONEJO	Inhalatorio (LD50) RATA	Grado Toxicidad referido a la toxicidad aguda o referencia
1	Tolueno	Tolueno	300	500	14000	5320	Tóxico
2	Ciclohexanona	Ciclohexanona	100	1400	948	8000	Nocivo
3	Crodamol AB	C12-15 Alquil Benzoato	No establecido	2000	No establecido	No establecido	Baja Toxicidad
4	Crodamol GTCC	Caprilico/Caprico Triglicerido	No establecido	2000	No establecido	No establecido	Baja Toxicidad
5	Rhodiasolv Green 21	Mezcla solventes contiene acetofenona	No establecido	2000	No establecido	No establecido	Baja Toxicidad
6	Rhodiasolv Green 25	Mezcla solventes 2-etilhexil acetato y acetofenona	No establecido	2000	No establecido	No establecido	Baja Toxicidad
7	Prifer	Éster Benzoato	No establecido	2000	No establecido	No establecido	Baja Toxicidad
8	Crodamol IPM	Isopropil Myristato	No establecido	2000	No establecido	No establecido	Baja Toxicidad
9	Crodamol STS	PPG-3 Bencil éter Miristato	No establecido	2000	No establecido	No establecido	Baja Toxicidad
10	Agsolex 8	Caprilil pirrolidona	No establecido	2050	2000	No establecido	Baja Toxicidad
11	Solvesso 150	Nafta Pesado de Petróleo	100	5000	2000	590	Nocivo
12	Crodamol IPP	Isopropil palmitato	No establecido	64000	No establecido	No establecido	Baja Toxicidad
13	Genagen 4166 (*),(**)	Ácido graso de Dimetilamina C8/C10	No establecido	2000	No establecido	No establecido	Baja Toxicidad
14	Genagen 4166 (*),(**)	Ácido graso de Dimetilamina C10/C12	No establecido	2000	No establecido	No establecido	Baja Toxicidad

\* Información obtenida de MSDS. \*\*EPA 920

En base a los datos obtenidos de las fichas de seguridad de los solventes, los productos de mayor cuidado son: Tolueno, ciclohexanona y solvesso 150. A continuación se mencionan datos sobre cada uno de estos productos.

**Tolueno (CAS 108-88-3):** el tolueno provoca efectos tóxicos tales como aumento en el peso del riñón en ratas a una dosis oral de 0.08mg/kg-día; a una dosis de 5mg/kg-día por vía inhalatoria puede provocar efectos neurológicos en los trabajadores expuestos. Los efectos para la salud por inhalación de vapores pueden ser irritaciones en vías respiratorias, efectos en el sistema nervioso central embriaguez espasmos pérdida del conocimiento parálisis respiratoria paro cardiovascular; por ingestión causa vómitos; absorción en contacto con la piel causa irritaciones y dermatitis tras contactos prolongados con el producto. Presenta riesgo de absorción cutánea por contacto ocular causando irritaciones en mucosas [32].

La siguiente información fue obtenida de la MSDS del producto. Datos de toxicidad aguda se han establecido en TLV: 50 ppm como TWA; (piel); A4 (no clasificable como cancerígeno humano); BEI establecido; (ACGIH 2004). MAK: Riesgo para el embarazo: grupo C; (DFG 2004). LEP UE: 192 mg/m<sup>3</sup>, 50 ppm como TWA; 384 mg/m<sup>3</sup>, 100 ppm como STEL (piel) (EU 2006). La información toxicológica se observa en la tabla 9.

Los efectos sobre el medio ambiente se han evaluado en algunas especies: para las Bacterias (*Photobacterium phosphoreum*) 18 mg/l se lo considera extremadamente tóxico (Test EC50 (mg/l), para las Algas (*Sc. quadricauda*) 120 mg/l es Altamente tóxico, para los Crustáceos (*Daphnia Magna*) 60 mg/l es Extremadamente tóxico, para los Peces (*Leuciscus Idus*) 70 mg/l es extremadamente tóxico, para los peces (*Salmo gairdneri*) 58 mg/l es Extremadamente tóxico.

Se ha determinado que el riesgo para el medio acuático es alto y el riesgo para el medio terrestre es medio debido a que es un producto de baja degradabilidad y es posible bioacumulador. Los datos han sido obtenidos de su hoja de seguridad.

**Ciclohexanona (CAS 108-94-1):** la ciclohexanona está en la lista de EPA aceptada como un ingrediente inerte para uso en animales como solvente y co-

solvente [33]. La ciclohexanona puede tener efectos tóxicos tales como necrosis celular, a una dosis oral en ratones de 5mg/kg-día se han detectado que provoca efectos críticos como la depresión de peso corporal [34]. El efecto crítico de la ciclohexanona es la irritación de los ojos y del tracto respiratorio superior. Hay pruebas de que exposiciones de humanos de entre 3 y 5 minutos con ciclohexanona a concentraciones tan bajas como 75 ppm (306 mg/m<sup>3</sup>) que provocan irritación de garganta y de ojos. En este mismo estudio se consideró que una concentración de 25 ppm (102 mg/m<sup>3</sup>) resultaba tolerable para la mayoría de individuos en este corto periodo de exposición [35]. La información toxicológica se observa en la tabla 9.

La siguiente información fue obtenida de la MSDS del producto. Los efectos sobre el medio ambiente de la ciclohexanona se han evaluado en algunas especies y medios de descarga. Se considera que puede causar efectos nocivos agudos sobre los organismos acuáticos. La toxicidad en peces fue de CL50 (96 h) > 100 mg/l, en invertebrados acuáticos (dafnias) CE50 (24 h) > 100 mg/l, en plantas acuáticas (algas) CE50 (72 h) > 10 - 100 mg/l. Los datos han sido obtenidos de su hoja de seguridad.

**Nafta Pesado de Petróleo (CAS 64742-94-5):** es una mezcla compleja de productos de destilación, se lo expende con marcas comerciales como Cyclosol, Solvesso, Shellsol. La hoja de seguridad nos aporta la información indicada a continuación. La composición del solvesso es la siguiente: 95% - 100% Solventes aromáticos pesados de petróleo (CAS 64742-94-5), 0%-5% naftaleno (CAS 91-20-3), 0%-2% cumeno (CAS 98-82-8), 0%-2% trimetilbenceno (CAS 95-63-6), cabe anotar que esta composición puede cambiar según el origen del producto. La serie de productos de nafta pesado de petróleo suele usarse debido a que contiene un buen poder disolvente y un punto de inflamación elevado, sin embargo los compuestos residuales que contiene como el naftaleno son productos que pueden perjudicar la salud. Los datos de toxicidad para el naftaleno son TWA/TLV: 10/50 mg/m<sup>3</sup> (piel), LD50 Oral: 1870 mg/m<sup>3</sup>, LD50 Dermal: >2500 mg/m<sup>3</sup>, LC 50ppm Inhalación: 106-142mg/m<sup>3</sup>.

La exposición aguda a este solvente puede producir irritación en la piel, irritación ocular, dolores de cabeza. Los efectos de una exposición crónica

podrían ser dermatitis, y existe la posibilidad de carcinogénesis por la presencia de naftaleno en su composición.

En el medio ambiente el producto no se considera como bioacumulador, su degradación se efectúa en presencia de oxígeno, el 40% se degrada en 4 semanas en lodos de aguas residuales domésticas sin embargo la población natural de microbios necesita varias semanas de aclimatización antes de que pueden metabolizar los hidrocarburos efectivamente. En medios de degradación abióticos muchos hidrocarburos aromáticos son susceptibles tanto a la fotólisis directa e indirecta, la velocidad de degradación es desconocida. El solvente es insoluble en agua por lo que no puede moverse en el suelo o en agua. La toxicidad para los animales acuáticos ha sido determinada en algunas especies tales como peces cuyo LC50 (96h) para *Pimephelas promelas* es 41-45mg/l y para *Oncorhynchus mykiss* es de 2.34mg/litro, el EC 50 en crustáceos por 48h es de 0.95mg/litro (*daphnia magna*) y el EC 50 en algas es de 0.1-2.5 mg/Lt, sin embargo, estos valores no consideran que la toxicidad también puede darse en concentraciones más altas debido a que su baja solubilidad en agua hace que el producto forme una capa que flota sobre el medio acuoso. Los datos han sido obtenidos de su hoja de seguridad.

## **1.6 Legislación Nacional e Internacional.**

En el Ecuador el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAGAP) es el ente regulador de la producción agrícola, ganadera, acuícola y pesquera del país. Este organismo nacional se apoya en la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de Calidad del Agro – Agrocalidad, que es la Autoridad Nacional Sanitaria, Fitosanitaria y de Inocuidad de los Alimentos, encargada de la definición y ejecución de políticas, regulación y control de las actividades productivas del agro nacional. La cual, es respaldada por normas nacionales e internacionales [20].

El control de los productos veterinarios está regido por la Decisión 483 de la Comunidad Andina de Naciones Normas de registros, control, comercialización de productos Veterinarios [21] publicada en Registro Oficial No. 257 de fecha 01 de Febrero 2001, el art. 60 de esta norma establece que “todo producto

veterinario deberá satisfacer las siguientes normas de control de calidad: a) Calidad y cantidad de las materias primas usadas: -Cumplimiento de las exigencias que precisen las normas de referencia internacional citadas en el anexo 1, para el o los principios activo así como para los excipientes, cuando dichos compuestos estén incluidos. Cuando los compuestos no estén incluidos en farmacopeas reconocidas por los países miembros, se deberá presentar un resumen sobre su origen y sistema de obtención, utilizando denominaciones exactas presentar un resumen sobre su origen y sistema de obtención, utilizando denominaciones exactas en los términos químicos o biológicos, con clara definición de los requisitos para la determinación de calidad, de manera que permita la identificación y cuantificación de su química, físico-química y biológica, en forma constante y científicamente satisfactoria. ..”

En el anexo 1, de la decisión 483, se mencionan las siguientes normas de referencia reconocidas por suministrar información confiable de aspectos técnicos relacionados con la calidad e inocuidad de las materias primas:

- Decisiones del Consejo Andino de Ministros de Relaciones Exteriores o de la Comisión de la Comunidad Andina y Resoluciones de la Secretaría General de la Comunidad Andina;
- Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP);
- Código de Regulaciones Federales del gobierno de los Estados Unidos de América (CFR);
- Farmacopea Británica;
- Codex Alimentarius Food and Agricultural Organization (FAO) Organización de la Salud (OMS);
- Normas de la FAO;
- Normas de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE);
- Normas adoptadas por organizaciones regionales o subregionales como MERCOSUR;
- Comité de Expertos de la OMS en especificaciones para las preparaciones farmacéuticas. Anexo 1. Buenas prácticas de manufactura.

Estas referencias nos permiten emplear como directriz para el actual estudio, las normas CIPAC (Collaborative International Pesticides Analytical Council) y las normas australianas de la APVMA (Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority), específicamente The Guidelines for the Generation of Storage Stability Data of Veterinary Chemical Products No. 68, versión 3 June 2006 [21,29].

Estas normas proveen de datos específicos sobre técnicas de análisis para distintos tipos de formulaciones así como las guías para evaluar la estabilidad de estos formulados.

## **1.7 Normativa Ambiental Ecuatoriana.**

Las sustancias químicas usadas en el Ecuador se encuentran reguladas por la Normativa Ambiental bajo el Texto Unificado de Legislación Secundaria, Medio Ambiente (TULSMA), así como por procedimientos y normas técnicas previstas en las Leyes de Gestión Ambiental y de Prevención y Control de la Contaminación Ambiental, Convenios Internacionales relacionados con esta materia, suscritos y ratificados por el Estado.

A nivel internacional los ingredientes inertes empleados en productos pesticidas para uso veterinario o agrícola también están regulados. Existen organismos importantes que proveen de información detallada sobre el uso de sustancias química tales como la EPA (Environmental Protection Agency) en Estados Unidos y la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos (ECHA) en Europa.

En el texto Unificado de la Legislación Secundaria, Medio Ambiente (TULSMA), en el Libro VI de la Calidad Ambiental encontramos parámetros de monitoreo de contaminantes en el agua y en el suelo. El Libro VI de la Calidad Ambiental fue modificado por última vez en abril del 2015 en base al acuerdo Ministerial No. 61 publicado en el registro oficial ecuatoriano el 7 de abril del 2015. Los anexos de este libro nos indican límites permisibles de descargas de contaminantes en agua y en suelo de los cuales el activo Amitraz no se menciona en ninguno de ellos sin embargo existen listados donde si se

consideran descargas que contengan productos pesticidas, derivados de hidrocarburos y aceites vegetales.

En el capítulo VII del TULSMA se regulan las fases de gestión y los mecanismos de prevención y control de la contaminación por sustancias químicas peligrosas, en el territorio nacional. En su artículo 154, se reconoce la existencia del listado de sustancias químicas peligrosas sujetas a control, las cuales se encuentran en los listados nacionales de sustancias químicas peligrosas aprobados por la Autoridad Ambiental Nacional. En su artículo 160, se indica la existencia del listado de sustancias químicas peligrosas prohibidas que no pueden ingresar al país. Los listados de este libro no mencionan de manera explícita al activo Amitraz sin embargo si se mencionan solventes como tolueno, ciclohexanona y sustancias como el naftaleno que forma parte de los solventes de nafta pesado de petróleo.

### **1.7.1. Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes.**

La norma corresponde al Anexo 1 del Libro VI del TULSMA que indica los límites permisibles de descarga de efluentes. A continuación se enlistan las tablas con los criterios de evaluación en distintas aguas los cuales deberán tomarse en cuenta al momento de elaborar y manipular productos pesticidas que contengan los solventes enlistados en la tabla 9.

**Tabla 10.** Criterios de Calidad de Fuentes de Agua para Consumo Humano Y Doméstico. Requieren tratamiento Convencional (Compendio tomado de la Tabla 1 del Anexo 1 del Libro VI del TULSMA).

<b>Parámetro</b>	<b>Expresado como</b>	<b>Unidad</b>	<b>Criterio de Calidad</b>
Aceites y grasas	Sustancias solubles en hexano	mg/ml	0.3
Hidrocarburos Totales de Petróleo	TPH	mg/ml	0.2

**Tabla 11.** Criterios de Calidad de Fuentes de Agua para Consumo Humano Y Doméstico y que para su potabilización solo requieren desinfección (Compendio tomado de la Tabla 2 del Anexo 1 del Libro VI del TULSMA).

<b>Parámetro</b>	<b>Expresado como</b>	<b>Unidad</b>	<b>Criterio de Calidad</b>
Aceites y grasas	Sustancias solubles en hexano	mg/ml	0.3
Hidrocarburos Totales de Petróleo	TPH	mg/ml	0.05

En condiciones especiales de ausencia de estudios del cuerpo receptor, se tomará en cuenta los valores siguientes.

**Tabla 12.** Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce (Compendio tomado de la Tabla 10 del Anexo 1 del Libro VI del TULSMA).

<b>Parámetro</b>	<b>Expresado como</b>	<b>Unidad</b>	<b>Criterio de Calidad</b>
Aceites y grasas	Sustancias solubles en hexano	mg/ml	30
Hidrocarburos Totales de Petróleo	TPH	mg/ml	20

Los límites de descargas hacia cuerpos de agua marina, se observan en la tabla siguiente.

**Tabla 13.** Límites de descarga a un cuerpo de agua marina (Compendio tomado de la Tabla 11 del Anexo 1 del Libro VI del TULSMA).

<b>Parámetro</b>	<b>Expresado como</b>	<b>Unidad</b>	<b>Criterio de Calidad</b>
Aceites y grasas	Sustancias solubles en hexano	mg/ml	30
Hidrocarburos Totales de Petróleo	TPH	mg/ml	20

En la sección 5.2.4.11 se prohíbe la descarga de residuos líquidos sin tratar hacia los cuerpos receptores, canales de conducción de agua a embalses, canales de riego o canales de drenaje pluvial, provenientes del lavado y/o mantenimiento de vehículos aéreos y terrestres, así como el de aplicadores manuales y aéreos, recipientes, empaques y envases que contengan o hayan contenido agroquímicos u otras sustancias tóxicas.

En la sección 5.2.1.2 se establecen, también, los parámetros mínimos de descarga a analizarse o monitorearse en industrias importantes, identificados por su Código Internacional Industrial Uniforme (CIIU). Dentro de ésta sección se han identificados las siguientes actividades a considerar: literal A. Agricultura, Ganadería, Caza y Silvicultura, y literal D. Industrias Manufactureras.

**Tabla 14.** Parámetros de Monitoreo de las Descargas Industriales (Compendio tomado de la Tabla 12 del Anexo 1 del Libro VI del TULSMA).

CIUU	ACTIVIDAD INDUSTRIAL	PARÁMETROS DE MONITOREO
<b>A. AGRICULTURA, GANADERÍA, CAZA Y SILVICULTURA</b>		
0121	Cría especializada de ganado vacuno	Caudal, DBO, DQO, SST, SAAM, Grasas y aceites, Fenoles, Residuos de ingredientes activos de plaguicidas, Nitrógeno Total (N), Fósforo Total (F), Coliformes Fecales.
0124	Actividad Mixta (agrícola y pecuario)	
0124	Actividades de servicios agrícolas y ganaderos, excepto actividades agropecuarias	
<b>D. INDUSTRIAS MANUFACTURERAS</b>		
2421	Fabricación de plaguicidas y otros productos químicos de uso agropecuario	Caudal, DBO, DQO, SST, SAAM, Grasas y aceites, Fenoles, Residuos de ingredientes activos de plaguicidas, Arsénico (As), Bario (Ba), Cadmio (Cd), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Mercurio (Hg), Níquel (Ni), Selenio (Se), Cinc (Zn).

## 1.7.2. Norma de Calidad Ambiental del Recurso Suelo y Criterios de Remediación para Suelos Contaminados.

La norma corresponde al anexo 2 del Libro VI del TULSMA que indica explícitamente la prohibición de descargas, infiltración o inyección de efluentes en el suelo y subsuelo (sección 4.2.5) que lo alteren, se debe evaluar una posible contaminación del suelo, en función de los parámetros señalados en la Tabla 1 de éste anexo, en la Tabla 2 se observan los criterios de remediación.

**Tabla 15.** Criterios de Calidad del Suelo (Compendio tomado de la Tabla 1 del Anexo 2 del Libro VI del TULSMA).

Parámetro	Unidades (Concentración en peso seco de suelo)	Valor
<b>Parámetros orgánicos</b>		
Tolueno	mg/kg	0.1
Hidrocarburos totales (TPH)	mg/kg	<150
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) cada tipo	mg/kg	0.1

**Tabla 16.** Criterios de Remediación (Valores máximos permitidos), (Compendio tomado de la Tabla 2 del Anexo 2 del Libro VI del TULSMA).

Parámetros	*Unidad	Uso del Suelo			
		Residencial	Comercial	Industrial	Agrícola
<b>Parámetros orgánicos</b>					
Aceites y grasas	mg/kg	500	< 2500	< 4000	< 4000
Tolueno	mg/kg	0.37	0.8	0.8	0.08
Hidrocarburos totales(TPH)	mg/kg	230	620	620	150
Alifáticos no clorinados (cada tipo)	mg/kg	-	-	-	0.3
<b>Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)</b>					
Naftaleno	mg/kg	0.6	22	-	0.1

\*Concentración en peso del suelo

### **1.7.3. Sustancias Peligrosas**

En el Acuerdo Ministerial No. 161 del 31 de agosto del 2011, publicado en el Registro Oficial No. 631 del 1 de febrero del 2012, el Ministerio del Ambiente emite el Reglamento para la Prevención y Control de la Contaminación por Sustancias Químicas Peligrosa, Desechos Peligrosos y Especiales. Mediante Informe Técnico No. 933-2012IDNCAISCA/MAE del 10 de septiembre el 2012, la Dirección Nacional de Control Ambiental del Ministerio del Ambiente, estructura los listados nacionales de sustancias químicas peligrosas, desechos peligrosos y especiales; a través del Acuerdo Ministerial 142 se expiden los Listados Nacionales de Sustancias Químicas Peligrosas, Desechos Peligrosos y Especiales de donde se toma en consideración los siguientes artículos:

Art. 1.- Serán consideradas sustancias químicas peligrosas, las establecidas en el Anexo A del presente acuerdo.

Art. 2.- Serán considerados desechos peligrosos, los establecidos en el Anexo B del presente acuerdo.

Art. 3- Serán considerados desechos especiales los establecidos en los Anexo C del presente acuerdo

Se revisaron los anexos mencionados en el acuerdo ministerial 142 con el fin de identificar si algunas de las sustancias usadas como solventes y activos forman parte de alguna de las listas. Se obtuvieron los siguientes resultados de la búsqueda:

#### **a) ANEXO A: Listado Nacional De Sustancias Químicas Peligrosas.**

En los listados No 1. (Listado de Sustancias Químicas Peligrosas Prohibidas) y No. 2 (Listado de Sustancias Químicas Peligrosas de Toxicidad Aguda), no se encontraron productos afines a las materias primas usadas.

En el Listado No. 3 (Listado Nacional de Sustancias Químicas Peligrosos de Toxicidad Crónica) se encontraron dos productos que se usan como solventes: Tolueno y Ciclohexanona. Adicionalmente se menciona al producto Naftaleno

el cual formar parte de los solventes derivados de la nafta de petróleo tal como el Solvesso 150 usado en los ensayos.

**b) ANEXO B: Listados Nacionales de Desechos Peligrosos.**

**LISTADO No 1: Desechos Peligrosos por Fuente Específica**

En el listado 1 del anexo B se han identificado los siguientes puntos a considerar como posibles desechos peligrosos dentro de las actividades agrícolas, veterinarias y de manufactura que podrían derivarse del uso y fabricación de estos formulados que contienen Amitraz como concentrado emulsionable.

**Tabla 17.** Desechos Peligrosos por Fuente Específica (Compendio tomado del Listado 1 del Anexo B del Acuerdo Ministerial 142).

CIU	Descripción de categorías	CRTIB*	Código	Código Basilea
<b>A</b>	<b>Agricultura, Ganadería, Silvicultura y Pesca</b>			
<b>1</b>	<b>Agricultura, floricultura, ganadería, caza y actividades de servicios conexas: fumigación aérea, terrestre, tratamiento de semillas, control de plagas</b>			
	Lodos de lavado y limpieza que contengan plaguicidas	T	A.01.01	Y4
	Aguas residuales que contengan plaguicidas	T	A.01.02	Y4
	Lodos contaminados con plaguicidas provenientes del tratamiento de efluentes.	T	A.01.03	Y4
	Agroquímicos caducados, obsoletos o fuera de especificaciones	T (1)	A.01.04	Y4/ A4140
	Lodos de tanques de almacenamiento de aceites agrícolas	T, I	A.01.05	Y8
	Envases vacíos de plaguicidas sin triple lavado	T	A.01.06	Y4
<b>C</b>	<b>INDUSTRIAS MANUFACTURERAS</b>			
<b>20</b>	<b>Fabricación y formulación de sustancias y productos químicos: sustancias químicas básicas, producción de cloro, grasas, aceites, solventes,</b>			

	<b>monómeros, polímeros, caucho sintéticos, plaguicidas, pinturas, lacas, barnices, esmaltes, pegamentos, sellantes, tintas de impresión, jabones, detergentes, plastificantes, resinas, aditivos, emulsificantes, bactericidas, productos de limpieza, perfumes, fibras artificiales, ácidos, bases, abonos, agentes oxidantes, thinner, explosivos, retardantes de llama, etc.</b>			
	Lodos del tratamiento de efluentes que contienen sustancias peligrosas	T	C.20.01	A2030
	Productos químicos elaborados, semielaborados, agroquímicos: caducados o productos fuera de especificaciones.	T,I,C, R (2)	C.20.03	A4140
	Desechos que contengan solventes orgánicos.	I	C.20.12	Y6
	Desechos del proceso de producción que contengan sustancias peligrosas.	T	C.20.14	A4140
	Efluentes del triple lavado de envases de agroquímicos o químicos.	T	C.20.15	Y4
	Material adsorbente utilizado en la recolección y limpieza de derrames de materiales peligrosos.	T	C.20.16	Y18
<b>21</b>	<b>Fabricación de productos farmacéuticos, sustancias químicas medicinales y productos botánicos de uso farmacéutico (humano y animales)</b>			
	Desechos resultantes de la producción y preparación de productos farmacéuticos que contienen constituyentes peligrosos.	T	C.21.01	Y2
	Desechos resultantes de la producción y preparación de productos veterinarios que contienen constituyentes peligrosos.	T	C.21.02	Y2
	Medicamentos, productos farmacéuticos, psicotrópicos, botánicos y veterinarios fuera de especificaciones o caducados.	T	C.21.03	Y3
	Desechos resultantes de la producción, preparación de biocidas y productos fitofarmacéuticos.	T	C.21.04	Y4
	Materias primas caducadas o fuera de especificaciones.	T	C.21.05	Y3
	Desechos biológicos no inactivados de la producción.	B	C.21.06	Y2
	Tortas de filtración, carbón activado que contienen	T	C.21.07	Y2

	sustancias peligrosas			
<b>75</b>	<b>Actividades veterinarias</b>			
	Fármacos veterinarios caducados o fuera de especificaciones	T	M.75.04	Y3

\*C: Corrosivo, I: inflamable, R: Radioactivo, T: Tóxico, B: Biopeligroso.

### c) LISTADO No.2: Listado de Desechos Peligrosos por Fuente No Específica

En el listado 2 del anexo B podemos destacar los puntos mencionados en la tabla 18, los cuales puede deben ser tomados en consideración al momento de elaborar un concentrado emulsionable que contenga algún pesticida o aditivo contaminante.

**Tabla 18.** Listado de Desechos Peligroso por fuente no específica (Compendio tomado del Listado 2 del Anexo B del Acuerdo Ministerial 142).

DESECHO PELIGROSO	CRTIB	Código	Código Basilea
Agroquímicos caducados o fuera de especificaciones generados en actividades comunes	T	NE-04	Y4
Envases vacíos de agroquímicos sin triple lavado.	T	NE-28	A4030
Mezclas oleosas, emulsiones de hidrocarburos- agua, desechos de taladrina.	T	NE-45	Y9
Productos químicos caducados o fuera de Especificaciones.	T, t, C, R (2)	NE-48	A4140

\*C: Corrosivo, I: inflamable, R: Radioactivo, T: Tóxico, B: Biopeligroso.

### d) ANEXO C: Listado Nacional de Desechos Especiales

Las empresas formuladoras de productos pesticidas deberán tener en consideración la correcta disposición de sus envases según aplique el anexo C del acuerdo ministerial 142.

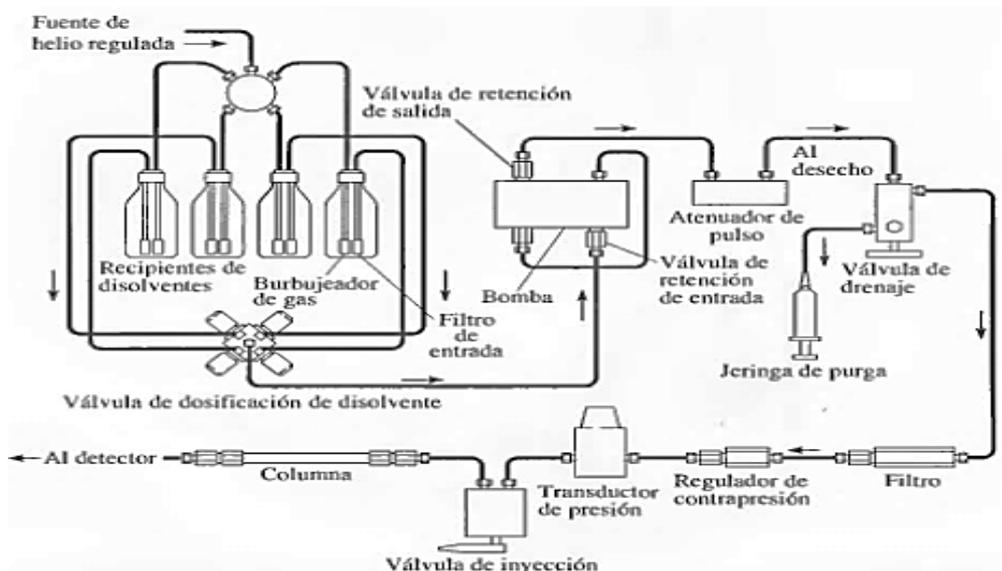
## 1.8 Técnicas Analíticas.

### 1.8.1. Cromatografía.

La cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes a ser separados se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es estacionaria (la fase estacionaria), mientras que la otra (la fase móvil) se mueve en una definida dirección. Una fase móvil se describe como "un fluido que se filtra a través o a lo largo del lecho estacionario en una dirección definida". Puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico, mientras que la fase estacionaria puede ser un sólido, un gel o un líquido [26].

El término "cromatografía de alta resolución" se usa frecuentemente para distinguir procedimientos cromatográficos con mayor tecnología, de los procedimientos sencillos en columnas básicas usadas en sus inicios. Para lograr una velocidad de flujo satisfactoria, el líquido se somete a una presión de cientos de libras por pulgadas cuadradas (psi), que pasan a través de empaquetamientos con diámetros de partículas de relleno de apenas 3 -10  $\mu\text{m}$ . Como consecuencia de esta alta presión, el equipo de HPLC tiende a ser mucho más complejo y costoso que el de otros equipos de cromatografía. En la ilustración 3 se muestra los componentes básicos de un equipo de HPLC típico [27].

**Ilustración 3.** Esquema de un equipo HPLC. [27].

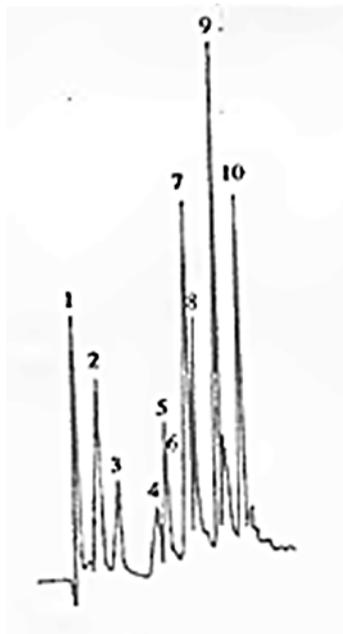


Usualmente se emplean diferentes recipientes para contener los disolventes, estos disolventes pasarán a través de una serie de filtros que retendrán las impurezas sólidas insolubles que estos puedan tener.

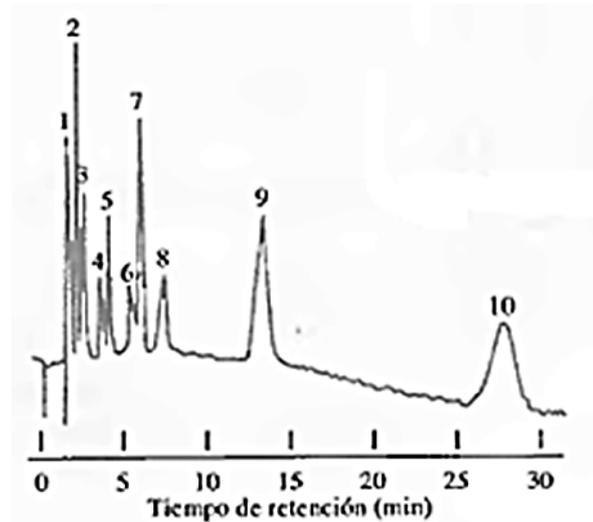
Existe también una válvula que permite hacer las mezclas de los disolventes según sea el tipo de elución que se emplee, el líquido pasa luego a la bomba que genera la presión y luego por varios filtros hasta que llegue a la válvula de inyección donde se inyecta la muestra y con la misma presión entra a la columna. Las columnas para HPLC se construyen normalmente con acero inoxidable y polímeros especiales.

La mayoría tienen una longitud de 10 a 30 cm. Las columnas usan rellenos de diferente naturaleza, los rellenos básicos son de tipo pelicular y de partícula porosa. Los rellenos peliculares son utilizados normalmente en las precolumnas y consisten en bolas de vidrio de polímero, no porosas de sílice, alúmina o de una resina de intercambio iónico. Los rellenos de partícula porosa son los más comunes y están formados por micropartículas porosas con diámetro de 3 a 10  $\mu\text{m}$  de sílice, alúmina o de una resina de intercambio iónico. Los detectores básicos empleados pueden dividirse en los basados en una propiedad de la fase móvil (disolución) y los basados en una propiedad del soluto. Los basados en la fase móvil pueden ser detectores de índice de refracción, electroquímicos, y de dispersión de luz; los basados en el soluto pueden ser detectores de absorbancia UV, IR y de fluorescencia.

La cromatografía líquida puede realizarse utilizando solo un eluyente compuesto por un único solvente o una mezcla única de solventes, lo cual se conoce como elución isocrática o puede usar varios disolventes en proporciones que varían con el tiempo, en este caso se dice que es una elución con gradiente. En las figuras 4 y 5 se muestran los tipos de eluciones usadas en HPLC, la elución con gradiente normalmente mejora la eficiencia de la separación de los picos [27].



**Ilustración 4.** Elusión por Gradiente [27].



**Ilustración 5.** Elusión Isocrática [27].

Las muestras a emplear deben ser tratadas antes de ser inyectadas en el cromatógrafo de líquidos con el objetivo de eliminar sustancias e impurezas contaminantes, filtrar sólidos insolubles o para realizar un preparación de muestras enriquecidas selectivamente. Usualmente se realizan modificaciones en la fase de móvil de parámetros específicos tales como polaridad, pH, concentración, temperatura. Estas variaciones permitirán afinar el método para obtener resultados confiables.

El campo de aplicación de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es muy versátil. Su uso habitual puede ir desde el descubrimiento de nuevas drogas, desarrollo de producto hasta el control de calidad en la producción [25]. Su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles la hace muy útil para separar y determinar especies en diversos materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos.

La variedad de muestras a la que es aplicable ésta técnica es muy amplia, como ejemplo tenemos: hidrocarburos, aminoácidos, carbohidratos, agroquímicos, esteroides, antibióticos, especies organometálicos, entre otros.

## 1.8.2. Colorimetría.

El color es una propiedad visual perceptiva propia de los seres humanos. El color deriva del espectro de la luz (distribución de energía de la luz frente a longitud de onda) que interactúa en el ojo con células sensibles a la luz. En nuestro medio, los materiales son de color dependiendo de las longitudes de onda de la luz que reflejan o transmiten.

El espectro de color visible va desde rojo a través de longitudes de onda azules, aproximadamente 360 -720 nm.

Tres cosas son necesarias para ver los colores:

Una fuente de luz.

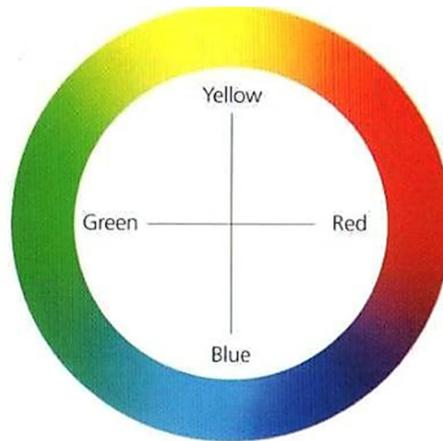
Un objeto

Un observador / procesador

Las percepciones e interpretaciones del color son altamente subjetivas. Factores como fatiga del ojo, edad, estrés pueden influenciar la percepción del color, es por ello que en análisis de líquidos y sólidos se emplean instrumentos que identifican explícitamente con precisión y objetivamente un color a través de la medición y comparación del color empleando estándares.

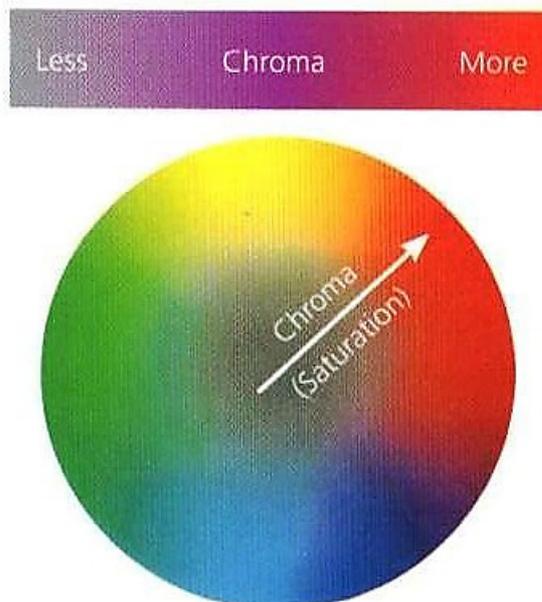
El color es típicamente descrito utilizando 3 elementos: tonalidad, saturación e intensidad luminosa (medida). Mediante la descripción de un color con estos tres atributos, se puede identificar con precisión un color particular y distinguirlo de cualquier otro

Describiendo cada elemento se puede decir que la tonalidad es cómo nosotros percibimos el color de un objeto a primera vista, rojo, verde, azul, etc. La ilustración 6 muestra una rueda de color donde se observa el color continuo de una tonalidad a otra. Observando la rueda vemos que si se va a mezclar pinturas azules y verdes se obtendrán colores azul-verdoso, si añadimos amarillo a un color verde se obtendrán tonos verde amarillento y así sucesivamente.



**Ilustración 6.** Tonalidad [28]

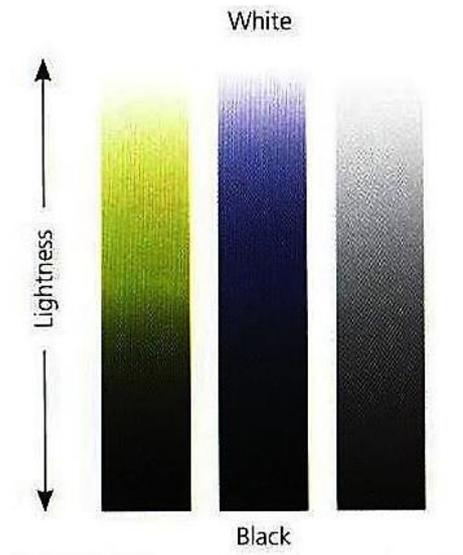
Se describe como saturación a la intensidad o la falta de brillo de un color, en otras palabras, lo cerca que está el color del tono gris o de su tonalidad pura. Por ejemplo, si comparamos los colores de un tomate y un rábano, el del tomate es más vívido mientras que el del rábano es más apagado. La ilustración 7 muestra los cambios o combinaciones de tonalidades de color que podrían obtenerse al mezclar los tonos básicos de la rueda de color vista anteriormente. Mientras más cerca estemos del centro los tonos se volverán más grises y mientras más alejados estemos los colores serán más brillantes.



**Ilustración 7.** Saturación [28]

La intensidad luminosa es el grado de luz que puede tener un color en un rango de claros a oscuro. Los colores pueden ser clasificados en claros y oscuros

cuando se compara su intensidad luminosa. Por ejemplo, cuando un tomate y un rábano son colocados el uno al lado del otro, el rojo del tomate parece ser mucho más brillante o luminoso. En contraste, el rábano tiene un color rojo más oscuro. En la ilustración 8, la luminosidad característica es representada en el eje vertical.

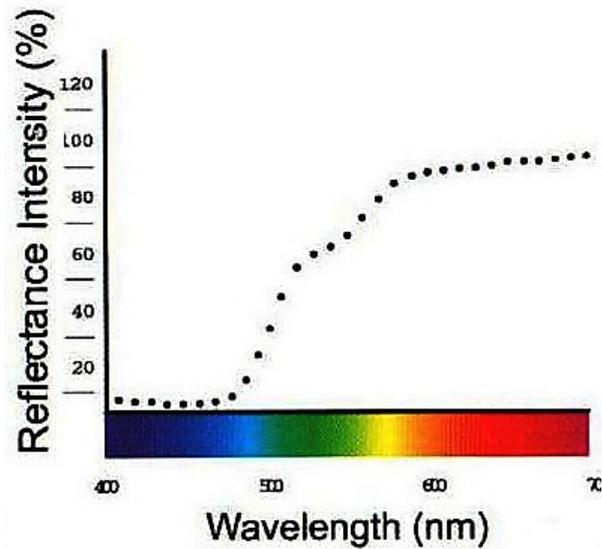


**Ilustración 8.** Luminosidad [28]

Hoy en día, los colorímetros, espectrofotómetros y colorímetros espectrofotométricos son los instrumentos más comúnmente usados para medir color en todo el mundo.

Esta tecnología permite medir la proporción de luz reflejada o transmitida en muchos puntos en el espectro visual. Los puntos se pueden representar gráficamente para formar una curva espectral. Dado que la curva espectral de cada color es totalmente única, como una firma o huella digital, la curva es una herramienta excelente para identificar y especificar un color respecto a otro.

Cuando un objeto interactúa con la luz, algunas de las longitudes de onda de luz son absorbidas y otros son reflejadas o transmitidas (en el caso de líquido de color claro).



**Ilustración 9.** Curva espectral de una muestra medida [28].

Por lo tanto, una bola roja absorbe todas las longitudes de onda de la luz, excepto para aquellos en la parte roja del espectro, la cual se refleja.

Una bola azul refleja sólo las longitudes de onda azules, un vaso de jugo de manzanas transmite longitudes de onda verde y amarillo. La nieve fresca refleja casi toda la luz que interactúa con ella y, por lo tanto, aparece en color blanco. El color negro es la ausencia de luz reflejada [28].

El campo de aplicación de la colorimetría es muy extenso. De manera general se puede decir que las industrias emplean estas técnicas para obtener datos de colores requeridos por ejemplo coloración de materias primas, colores de muestras de producción y para comparar colores en muestras sometidas a investigación. Es posible analizar una amplia gama de muestras, siempre que tengan estabilidad del color razonable [28]. Por ejemplo:

- Aceites y Grasas Comestibles
- Productos químicos y aceites industriales
- Aceites y combustibles derivados del petróleo
- Pinturas y Recubrimientos
- Plástico y caucho
- Productos farmacéuticos
- Hogar y Productos de Cuidado Personal
- Productos alimenticios y bebidas



## CAPÍTULO II

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Materiales.

A continuación se mencionan los materiales utilizados para la elaboración del estudio.

##### 2.1.1. Materia Prima.

El activo Amitraz técnico, pureza 97%, fue suministrado por el proveedor Nanjing Agrochemical. Stabaxol I, carbodiimida, (Reychemi). Los solventes fueron provistos por los proveedores:

1. Basic Chemical Solutions, L.L.C: Ciclohexanona.
2. J. T Baker: Tolueno.
3. Exxon: Solvesso 150 (Nafta Pesado de Petróleo).
4. ISP: Agsolex 8 (Caprilpirrolidona)
5. Clariant:
  - a) Genagen 4166 (Ácido graso de Dimetilamina C8/C10).
  - b) Genagen 4166 (Ácido graso de Dimetilamina C10/C12).
6. Rhodia:
  - a) Rhodiasolv Green 21 (Mezcla solventes contiene acetofenona).
  - b) Rhodiasolv Green 25 (Mezcla solventes 2-etilhexil acetato y acetofenona).
7. Croda:
  - a) Crodamol AB (Alquilbenzoato de C12 – C15)
  - b) Crodamol GTCC (Caprilico/Cáprico Triglicerido)
  - c) Prifer (Éster Benzoico)
  - d) Crodamol IPM (Isopropil Miristato)

- e) Crodamol STS (PPG-3 Bencil èter Miristato)
- f) Crodamol IPP (Isopropilpalmitato)

### 2.1.2 Reactivos.

Los estándares certificados de Amitraz, N-metilbis (2,4-xililiminometil) amina, con pureza del 97.4%, lote 21013 fueron suministrados por Ehrenstorfer Quality (Augsburg, Alemania).

El Acetonitrilo grado HPLC, lote I690230327, el cual fue suministrado por MERCK (Darmstadt, Alemania), el agua se obtuvo del equipo del sistema depurificación Elix Advantage, marca Millipore S.A.S modelo ZRX003TO, (Molsheim, Francia).

### 2.1.3 Equipos.

Para la preparación y evaluación de las muestras se utilizaron los siguientes equipos: Balanza analítica (Marca Adams, Modelo PW 254, Incubadora (Marca GEMMY CO. Modelo IN-010), Agitador magnético con calentamiento (Marca Thomas Scientific, Modelo n/d), Enfriador (Marca Polyscience, Serie 009500271).



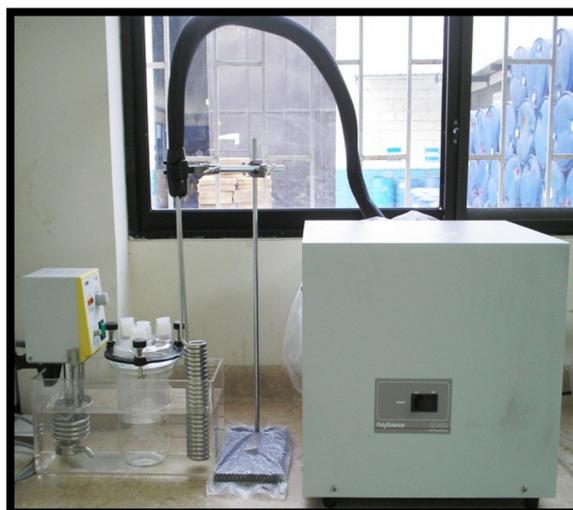
**Ilustración 10.** Incubadora (Marca GEMMY CO. Modelo IN-010) (Fuente: Autor).



**Ilustración 11.** Agitador magnético con calentamiento (Marca Thomas Scientific, Modelo n/d) (Fuente: Autor).



**Ilustración 12.** Incubadora (Marca GEMMY CO. Modelo IN-010) (Fuente: Autor).



**Ilustración 13.** Enfriador (Marca Polyscience, Serie 009500271) (Fuente: Autor).

La determinación fue llevada a cabo en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), marca Agilent Technologies, serie 1200(USA).

Se utilizó el Colorímetro Lovibond LC 100, Modelo RM200 para determinar la diferencia de color.



**Ilustración 14.** Colorímetro Lovibond LC 100, Modelo RM200 (Fuente: Autor).



**Ilustración 15.**  
Cromatógrafo de  
líquidos, marca Agilen  
Technologie con  
detector DAD (Fuente:  
Autor).

Los datos fueron procesados por el software ChemStation for LC 3D systems Versión 4.02, incorporado en el equipo de HPLC.

## 2.2 Métodos.

A continuación se muestran los procedimientos para elaborar y analizar las muestras estudiadas. Se han definido las siguientes etapas para la realización de los ensayos:

1. Elaborar soluciones concentradas que contienen Amitraz con 0%p/v, 4%p/v y 8%p/v de estabilizante.
2. Evaluar la estabilidad de las soluciones que contienen Amitraz a temperatura ambiente. Seleccionar soluciones estables.
3. Ensayar estabilidad de las soluciones seleccionadas, temperatura forzada:  $(0\pm 1)^{\circ}\text{C}$ ,  $54^{\text{a}}\text{C}$ . Seleccionar soluciones estables.

4. Determinar las diferencia de color y %p/p de ingrediente activo de las soluciones seleccionadas luego del envejecimiento forzado a  $(54\pm 1)^{\circ}\text{C}$ .

La realización del estudio se llevó a cabo usando un colorímetro marca Lovibond y un cromatógrafo HPLC-DAD.

Cuando las soluciones que contienen Amitraz se degradan presentan un cambio en su coloración, las soluciones pasan de un tono amarillo claro a tonos naranjas más fuertes. Como un método rápido de verificación de éste cambio de color se usó el método colorimétrico, luego se contrastó los resultados con los datos obtenidos en el cromatógrafo HPLC-DAD, con el fin de verificar si ese cambio de coloración se relaciona con la degradación del Amitraz.

### **2.2.1 Evaluación de diferentes solventes orgánicos de acuerdo al porcentaje de estabilizante utilizado en soluciones de Amitraz.**

Para la preparación de las muestras se emplearon los siguientes solventes:

- Tolueno
- Ciclohexanona
- Crodamol AB
- Crodamol GTCC
- Rhodiasolv Green 21
- Rhodiasolv Green 25
- Prifer
- Crodamol IPM
- Crodamol STS
- Agsolex 8
- Solvesso 150
- Crodamol IPP
- Genagen 4166
- Genagen 4166

En la siguiente tabla se muestran las propiedades físicas y químicas de cada solvente con los que se ha desarrollado el presente trabajo.

**Tabla 19.** Datos de las propiedades físicas de los solventes. (Fuente: MSDS cada compuesto)

Parámetros	Tolueno	Ciclohexano	Crodamol AB	Crodamol GTCC	Rhodiasolv Green 21	Rhodiasolv Green 25	Prifer 6813	Crodamol IPM	Crodamol STS	Agsolex 8	Solvesso 150	Crodamol IPP	Genagen 4166	Genagen 4296
Punto de inflamación °C	4.4	-	> 100	> 100	65	77	157	> 100	> 93	113	192	> 100	120	130
Punto de congelación °C	-95	-32	-	-	-	-	-	-	-	-25	-43	-	-20	-
Punto de fluidez °C	-	-	-	-	-8	-3	-57	-	-	-	-	-	-	-
Punto de nuble °C	-	-	4 °C	-5°C	-	-	-	4°C	-	-	-	12°C	-	-
Densidad g/cm <sup>3</sup>	0.866	0.78	0.9478	-	1.02	0.99	0.986	0.85	-	0.92	0.9	0.86	0.88	1.88
Solubilidad en agua	insoluble	parcialmente soluble	insoluble	insoluble	insoluble	insoluble	insoluble	insoluble	insoluble	ligeramente soluble	-	insoluble	insoluble	insoluble
%Humedad Karl Fischer*	0.03	0.0	0.08	0.150	0.430	1.59	0.07	-	0.25	2.16	0.03	0.61	0.23	0.4
% acidez expresado en H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> **	-	0.02	0.0	0.07	2.11	0.150	0.0	-	0.09	0.03	0.0	0.1	0.54	0.4

\*Valores obtenidos en laboratorio. \*\*Valores obtenidos por método CIPAC 31, volumen F.

### Preparación:

Se preparó una solución concentrada de Amitraz (97% pureza) al 33.3%p/v por cada solvente orgánico, se hacen muestras por triplicado. Éste concentrado sirve como base para preparar un formulado con una concentración final máxima de 200g.L<sup>-1</sup> o, si se desea, formulados con concentraciones menores. Se toma como base de cálculo un volumen final de 20ml y de ello se estima un 40% (8ml) de volumen para colocar aditivos (tensoactivos) por lo que las soluciones concentradas de Amitraz fueron preparadas para un volumen de 12ml. Se prepararon 3 tipos de soluciones base con concentraciones de estabilizante (Stabaxol I) al 0%p/v, 4%p/v y 8%p/v respecto a los 12ml. La tabla siguiente muestra la fórmula del concentrado de Amitraz usado en el estudio.

**Tabla 20.** Solución concentrada de Amitraz. (Fuente: Autor)

Materia Prima	Cantidades
Amitraz (97%)	4.13 g
Carbodiimida (Stabaxol I)	0g – 1.0g
Solvente	cps 12.0 mL

Se detallan a continuación las cantidades para cada tipo de solución preparada.

a) **Muestras con 0%p/v de estabilizante:** El Amitraz fue pesado en un tubo cónico y se añadió solvente hasta completar un volumen de 12 mL totales. Se calentó la muestra en baño maría a 60°C y se agitó el tubo cónico manualmente hasta completa disolución del activo.

Se asignó un código a cada concentrado preparado en base a cada solvente.

b) **Muestras con 4%p/v de estabilizante:** En un tubo cónico se pesaron 0.5g de carbodiimida (stabaxol I), se añadió 5ml de solvente y se calentó levemente en baño maría a 60°C hasta lograr la disolución del estabilizante. Se agregó 4.13g de Amitraz (97%) y se añadió solvente hasta completar un volumen de 12ml totales. Se calentó la muestra en baño maría a 60°C y se agitó el tubo cónico manualmente hasta completa disolución del activo.

Se asignó un código a cada concentrado preparado en base a cada solvente utilizado.

c) **Muestras con 8%p/v de estabilizante:** En un tubo cónico se pesaron 1g de estabilizante (stabaxol I), se añadió 5ml de solvente y se calentó levemente en baño maría a 60°C hasta lograr la disolución del estabilizante. Se agregó 4.13g de Amitraz (97%) y se añadió solvente hasta completar un volumen de 12ml totales. Se calentó la muestra en baño maría a 60°C y se agitó el tubo cónico manualmente hasta completar la disolución del activo.

Se asignó un código a cada concentrado preparado en base a cada solvente utilizado.

**Tabla 21.** Codificación de concentrados de Amitraz. (Fuente: Autor)

SOLVENTE		% p/v carbodiimida (Stabaxol I)			Código Muestra
Nombre Comercial	Nombre Químico	0%	4.00%	8.00%	
Tolueno	Tolueno	S-1	S-1-1	S-1-2	
Ciclohexanona	Ciclohexanona	S-2	S-2-1	S-2-2	
Crodamol AB	C12-15 Alquil Benzoato	S-3	S-3-1	S-3-2	
Crodamol GTCC	Caprilico/Caprico Triglicerido	S-4	S-4-1	S-4-2	
Rhodiasolv Green 21	Mezcla solventes contiene acetofenona	S-5	S-5-1	S-5-2	
Rhodiasolv Green 25	Mezcla solventes 2-etilhexil acetato y acetofenona	S-6	S-6-1	S-6-2	
Prifer	Éster Benzoato	S-7	S-7-1	S-7-2	
Crodamol IPM	Isopropil Myristato	S-8	S-8-1	S-8-2	
Crodamol STS	PPG-3 Bencil èter Miristato	S-9	S-9-1	S-9-2	
Agsolex 8	Caprilil pirrolidona	S-10	S-10-1	S-10-2	
Solvesso 150	Nafta Pesado de Petróleo	S-11	S-11-1	S-11-2	
Crodamol IPP	Isopropil palmitato	S-12	S-12-1	S-12-2	
Genagen 4166	Ácido graso de Dimetilamina C8/C10	S-13	S-13-1	S-13-2	
Genagen 4296	Ácido graso de Dimetilamina C10/C12	S-14	S-14-1	S-14-2	

A continuación se describe la forma de evaluar las muestras a (25+/-1) °C, (0+/-1)°C, (54+/-1)°C. Las soluciones concentradas de Amitraz se dividen en 3 fracciones para realizar cada estabilidad.

**Estabilidad (25+/-1)°C:** En esta fase se evalúa rápidamente la estabilidad de las soluciones concentradas a temperatura ambiente (25+/-1) °C. Se toma la tercera parte de las soluciones concentradas y se deja reposar por 7 días a la temperatura de (25+/-1) °C. Se evalúan diariamente las muestras y se registra cualquier cambio en la apariencia de la solución. Con los datos levantados se descarta aquellas soluciones que hayan formados cristales en esas condiciones.

**Estabilidad (0+/-1)°C:** Aquellas mezclas, seleccionadas luego de la estabilidad (25+/-1)°C, se evaluaron según el método CIPAC MT 39.3 VOL J. Otra tercera parte de la solución concentrada se colocó en un baño a (0+/-1) °C por 7 días. Un día después de haber sido colocada la solución en el baño se agrega un

cristal de activo y se deja en reposo hasta completar los 7 días. En el séptimo día se registra la presencia o ausencia de cristales y el porcentaje de cristales observados en base al total de muestra colocada para estabilidad. Inmediatamente, la muestra se deja a temperatura ambiente ( $25\pm 1$ ) °C por 24 horas, cumplido el tiempo se registra si los cristales formados se han re-disolto o no. Con los datos levantados se descartan aquellas soluciones en las que no se re-disolvieron los cristales [30]. Con este ensayo se puede asegurar que los productos elaborados como concentrados emulsionables o microemulsionables no formen cristales a bajas temperaturas.

**Estabilidad ( $54\pm 1$ )°C:** Las mezclas seleccionadas a ( $0\pm 1$ ) °C son las únicas que se someten a envejecimiento a ( $54\pm 1$ ) °C empleando el método CIPAC MT 46.3 VOL J. Una tercera parte de la solución concentrada es colocada en una incubadora a ( $54\pm 1$ ) °C por 14 días. Se registra cualquier cambio en la apariencia de la solución [30]. La evaluación de los concentrados a altas temperaturas, ( $54\pm 1$ ) °C, aporta información valiosa cuando se desea obtener un formulado estable que cumpla con el contenido de activo que se declare en la etiqueta. Ésta metodología es útil también con la formulación final que incluya los aditivos.

### **2.2.2 Determinación Cualitativa de la Degradación del Amitraz En base a la Diferencia de color de las Soluciones.**

Se analizaron las muestras sometidas a envejecimiento por 14 días a ( $54\pm 1$ ) °C, se compara con sus pares a temperatura ambiente. Se determina en ellas el cambio de color ( $\Delta E$ ) y se reporta el promedio del delta hallado en cada grupo de muestras. La diferencia de color determina cuál muestra tuvo mayor o menor cambio en su coloración, cuando el  $\Delta E$  sea más cercano a 0 menor cambio existirá.

El procedimiento de análisis de las muestras con el colorímetro Lovibond necesita de la creación de un estándar (muestra a temperatura ambiente) y de la medición de la muestra final (luego del envejecimiento acelerado) en comparación con el estándar inicial.

#### **Creación del Estándar:**

1. Calibrar el equipo presionando el botón de calibración automática.
2. Colocar la muestra estándar (muestra a temperatura ambiente) a analizar en la celda de vidrio.
3. Seleccionar la función editar estándar, presionar el botón medir con firmeza.
4. Continúe con las mediciones adicionales para obtener un valor promedio, (la configuración predefinida es 3 mediciones).
5. Cuando haya finalizado, presione el lado izquierdo de control de Navegación (Guardar) para guardar el nuevo estándar.
6. Establecer la tolerancia de las muestras en la función ajustes.

#### **Comparación de las muestras:**

1. Calibrar el equipo presionando el botón de calibración automática.
2. Colocar la muestra final (muestra después del envejecimiento acelerado) en la celda de vidrio.
3. Marcar el estándar deseado para realizar la comparación.
4. Presionar el botón medir con firmeza.
5. Continúe con las mediciones adicionales para obtener un valor promedio, (la configuración predefinida es 3 mediciones).
6. Después de medir, aparece un parche del color simulado de la muestra junto con la indicación Pasa/Falla junto el delta de color obtenido. El resultado indica si el color de la muestra se encuentra o no dentro de la tolerancia establecida inicialmente.
7. Cada medición se guarda automáticamente en el registro de la muestra.

### 2.2.3 Determinación Cuantitativa del porcentaje de degradación de Amitraz por HPLC

Para la determinación de la degradación del Amitraz por cromatografía se escoge al azar un par de las muestras analizadas con el colorímetro (muestra a temperatura ambiente y muestra envejecida a 54°C). Se cuantifica el %p/p de Amitraz presente en cada solución, la cuantificación se realiza por triplicado. El porcentaje de degradación de la muestra se determina conociendo la concentración de amitraz presente en la muestra a temperatura ambiente y la muestra envejecida a 54°C

**Cuantificación del Activo Amitraz por Cromatografía HPLC:** Para determinar la concentración del activo de partida y para evaluar la degradación del Amitraz en las distintas matrices se empleó cromatografía líquida de alta resolución. El método analítico usado en este estudio es un método validado. El cromatógrafo de líquidos Agilent Technologies fue ajustado con las siguientes condiciones de trabajo:

- Fase móvil: Acetonitrilo 80% - Agua 20%
- Longitud de onda: 288 nm, Bw 4, Ref 450, Bw 100
- Volumen de inyección: 5 µl
- Columna: PurospherStar RP-18e 125x4.0mm 5 µm
- Temperatura Columna: 25 °c
- Flujo: 1.5 ml\*min<sup>-1</sup>

Se prepararon las siguientes soluciones estándar:

**Solución Stock de Amitraz: (1000 mg.L<sup>-1</sup>):** Pesar de manera independiente 30 ± 0.1 mg del estándar primario o secundario en un matraz volumétrico (frasco limpio y seco). (se deberá considerar la pureza del estándar al momento de realizar los cálculos para el pesaje); agregar 25 mL de acetonitrilo HPLC,

tapar, agitar y sonicar hasta disolución total del estándar. Transferir a frasco de color ámbar y almacenar en un freezer.

**Solución Estándar de calibración:** De la solución estándar stock de Amitraz tomar, en recipientes separados, alícuotas de 1.0, 1.5 y 2.0 mL (registrar peso), agregar a cada uno 15 mL de fase móvil (anotar peso). Tapar inmediatamente y agitar. Rotular y almacenar en Freezer después de utilizar.

Para el análisis de las muestras se realizó el siguiente procedimiento:

**Ingrediente activo y formulados de amitraz:** Pesar por triplicado (con precisión de 0.1 mg) alrededor de 30 mg de Amitraz TC o su equivalente (para formulados), agregar (por peso) 25 ml de Acetonitrilo, anotar el peso, tapar y agitar o colocar en el ultrasonido hasta total disolución. Tomar 1 alícuota (por peso) de 1.5 ml, agregar (por peso) 15 ml de fase móvil. Tapar inmediatamente y agitar.

#### **2.2.4 Selección de Solventes más Estables que Contienen Amitraz.**

Se analizarán los datos obtenidos y se seleccionarán las soluciones que presenten menor degradación luego de culminar la prueba de estabilidad a altas temperaturas (54°C). Las matrices seleccionadas podrán ser puntos de partida para la formulación de un producto comercial como concentrado emulsionable o microemulsionable.



## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Resultados de la evaluación de la Solubilidad del Amitraz.

En la siguiente tabla podemos observar el comportamiento del Amitraz en cada solvente durante su disolución. Debe notarse que el Amitraz presenta, en ciertos casos, mayor dificultad de solubilizarse en unos solventes que en otros.

**Tabla 22.** Observaciones de la disolución de activo. (Fuente: Autor)

Código	Solvente	%p/v Carbodiimida	Observaciones			Color Observado de la solución Final
			Disolución	T (min)	Agitación Manual	
S-1	Tolueno	0%	Rápida	8	Leve	Líquido amarillo translúcido
S-1-1		4%	Rápida	10	Leve	Líquido amarillo translúcido
S-1-2		8%	Rápida	11	Leve	Líquido amarillo translúcido
S-2	Ciclohexanona	0%	Rápida	8	Leve	Líquido amarillo translúcido
S-2-1		4%	Rápida	9	Leve	Líquido amarillo translúcido
S-2-2		8%	Rápida	9	Leve	Líquido amarillo translúcido
S-3	Crodamol AB	0%	Lenta	30	Leve	Líquido amarillo translúcido
S-3-1		4%	Lenta	30	Leve	Líquido amarillo translúcido
S-3-2		8%	Lenta	33	Leve	Líquido amarillo translúcido
S-4	Crodamol GTCC	0%	Lenta	28	Leve	Líquido amarillo translúcido
S-4-1		4%	Lenta	30	Leve	Líquido amarillo translúcido
S-4-2		8%	Lenta	33	Leve	Líquido amarillo translúcido
S-5	Rhodiasolv Green 21	0%	Rápida	12	Leve	Líquido amarillo translúcido
S-5-1		4%	Rápida	12	Leve	Líquido amarillo translúcido
S-5-2		8%	Rápida	15	Leve	Líquido amarillo translúcido
S-6	Rhodiasolv Green	0%	Rápida	14	Leve	Líquido amarillo translúcido

S-6-1	25	4%	Rápida	14	Leve	Líquido amarillo traslúcido
S-6-1		8%	Rápida	15	Leve	Líquido amarillo traslúcido
S-7	Prifer	0%	Lenta	25	Leve	Líquido amarillo traslúcido
S-7-1		4%	Lenta	24	Leve	Líquido amarillo traslúcido
S-7-2		8%	Lenta	28	Leve	Líquido amarillo traslúcido
S-8	Crodamol IPM	0%	Lenta	35	Leve	Líquido amarillo traslúcido
S-8-1		4%	Lenta	35	Leve	Líquido amarillo traslúcido
S-8-2		8%	Lenta	38	Leve	Líquido amarillo traslúcido
S-9	Crodamol STS	0%	Lenta	33	Leve	Líquido amarillo traslúcido
S-9-1		4%	Lenta	36	Leve	Líquido amarillo traslúcido
S-9-2		8%	Lenta	40	Leve	Líquido amarillo traslúcido
S-10	Agsolex 8	0%	Rápida	9	Leve	Líquido amarillo traslúcido
S-10-1		4%	Rápida	10	Leve	Líquido amarillo traslúcido
S-10-2		8%	Rápida	12	Leve	Líquido amarillo traslúcido
S-11	Solvesso 150	0%	Rápida	15	Leve	Líquido amarillo traslúcido
S-11-1		4%	Rápida	16	Leve	Líquido amarillo traslúcido
S-11-2		8%	Rápida	16	Leve	Líquido amarillo traslúcido
S-12	Crodamol IPP	0%	Lenta	22	Leve	Líquido amarillo traslúcido
S-12-1		4%	Lenta	24	Leve	Líquido amarillo traslúcido
S-12-2		8%	Lenta	23	Leve	Líquido amarillo traslúcido
S-13	Genagen 4166	0%	Rápida	10	Leve	Líquido amarillo traslúcido
S-13-1		4%	Rápida	11	Leve	Líquido amarillo traslúcido
S-13-2		8%	Rápida	11	Leve	Líquido amarillo traslúcido
S-14	Genagen 4296	0%	Rápida	10	Leve	Líquido amarillo traslúcido
S-14-1		4%	Rápida	10	Leve	Líquido amarillo traslúcido
S-14-2		8%	Rápida	12	Leve	Líquido amarillo traslúcido

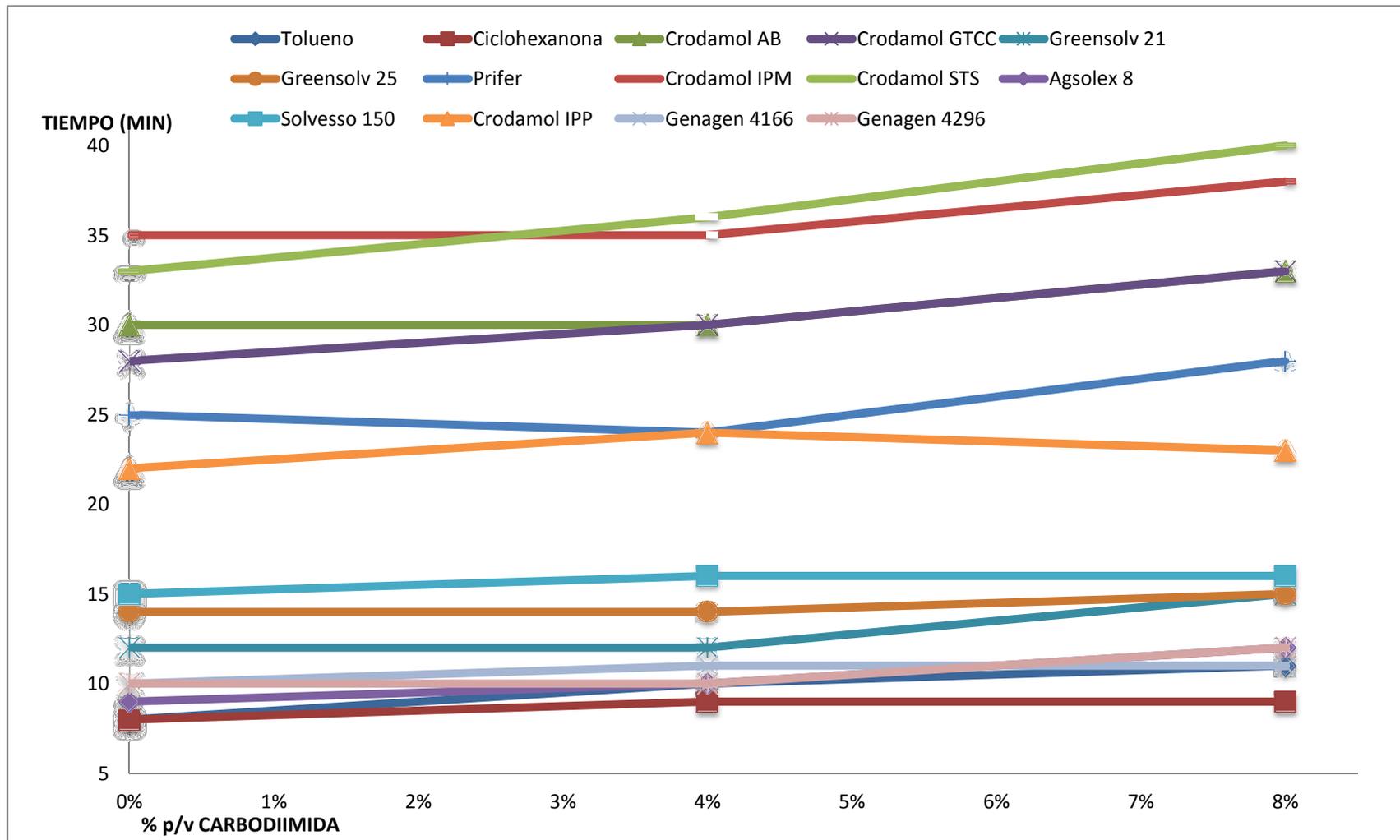
En la Gráfica 1 se observa que a medida que se añade la carbodiimida el tiempo que demora en solubilizarse el activo aumenta para algunos solventes.

En esta etapa los solventes que más facilidades presentaron para la disolución del amitraz se muestran en la Tabla 23 y en la Gráfica 1 se observa su comportamiento:

**Tabla 23.** Mezclas con menores tiempos de disolución. (Fuente: Autor)

SOLVENTE	% p/v carbodiimida			TIEMPO DISOLUCIÓN TOTAL(MIN)
	0%	4%	8%	
Tolueno	8	10	11	
Ciclohexanona	8	9	9	
Rhodiasolv Green 21	12	12	15	
Rhodiasolv Green 25	14	14	15	
Agsolex 8	9	10	12	
Solvesso 150	15	16	16	
Genagen 4166	10	11	11	
Genagen 4296	10	10	12	

**Gráfica 1.** Comportamiento del Amitraz durante la disolución en distintos solventes. (Fuente: Autor)



**Ilustración 16.** Soluciones concentradas de Amitraz. (Fuente: Autor)



En el anexo A se puede observar más ilustraciones de la preparación de las muestras concentradas.

### **3.2 Resultados de la Evaluación de la degradación del Amitraz con diferentes concentraciones de estabilizante.**

A continuación se muestran los resultados y evaluación del Amitraz a 3 temperaturas: temperatura ambiente ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), en frío ( $0\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) y a altas temperaturas ( $54\pm 1^{\circ}\text{C}$ ).

#### **a) Resultados a temperatura ambiente ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ):**

Luego de la evaluación de los concentrados dejados a temperatura ambiente, se obtienen los resultados mostrados en la Tabla 24.

**Tabla 24.** Resultados de evaluación de las soluciones a temperatura ambiente.  
(Fuente: Autor)

Código	Solvente	%p/v Carbodiimida	Día de observación	Presencia de Cristaliza
S-1	Tolueno	0%	7	No
S-1-1		4%	7	No
S-1-2		8%	5	SÍ
S-2	Ciclohexanona	0%	7	No
S-2-1		4%	7	No
S-2-2		8%	7	No
S-3	Crodamol AB	0%	3	SÍ
S-3-1		4%	2	SÍ
S-3-2		8%	1	SÍ
S-4	Crodamol GTCC	0%	7	No
S-4-1		4%	7	No
S-4-2		8%	4	Muy pocos
S-5	Rhodiasolv Green 21	0%	7	No
S-5-1		4%	7	No
S-5-2		8%	7	No
S-6	Rhodiasolv Green 25	0%	7	No
S-6-1		4%	7	No
S-6-1		8%	7	No
S-7	Prifer	0%	4	SÍ
S-7-1		4%	3	SÍ
S-7-2		8%	3	SÍ
S-8	Crodamol IPM	0%	5	SÍ
S-8-1		4%	4	SÍ
S-8-2		8%	4	SÍ
S-9	Crodamol STS	0%	3	SÍ
S-9-1		4%	2	SÍ
S-9-2		8%	2	SÍ
S-10	Agsolex 8	0%	7	No
S-10-1		4%	7	No
S-10-2		8%	7	No
S-11	Solvesso 150	0%	6	SÍ
S-11-1		4%	5	SÍ
S-11-2		8%	5	SÍ
S-12	Crodamol IPP	0%	4	SÍ
S-12-1		4%	3	SÍ
S-12-2		8%	3	SÍ
S-13	Genagen 4166	0%	7	No
S-13-1		4%	7	No

S-13-2		8%	7	No
S-14	Genagen 4296	0%	7	No
S-14-1		4%	7	No
S-14-2		8%	7	No

Los solventes que han fallado ésta prueba son: Prifer, Crodamol AB, Crodamol IPM, Crodamol STS, Solvesso 150. Todos presentaron cristales en las muestras con 0%, 4% y 8% de estabilizante.

Aquellas mezclas que se han mantenido sin formar cristales en concentraciones de estabilizante de 0% y 4% son las seleccionadas para la siguiente etapa evaluación a (0+/-1)°C. En el caso del Crodamol GTCC la muestras que contiene 8% presenta muy pocos cristales por lo que también se la ha incluido para la evaluación a (0+/-1)°C con el fin de verificar si estos cristales aumentan o se mantienen. En la tabla 25 se observan los solventes elegidos al pasar la prueba a (25+/-0.1)°C.

**Tabla 25.** Soluciones que no forman cristales (25+/- 0.1) °C. (Fuente: Autor)

SOLVENTE	% p/v carbodiimida			DÍAS
	0%	4%	8%	
Tolueno	7	7	7	
Ciclohexanona	7	7	7	
Crodamol GTCC	7	7	4	
Rhodiasolv Green 21	7	7	7	
Rhodiasolv Green 25	7	7	7	
Agsolex 8	7	7	7	
Genagen 4166	7	7	7	
Genagen 4296	7	7	7	

**Ilustración 17** Ejemplo de muestras que cristalizaron a temperatura ambiente  
(Fuente: Autor).



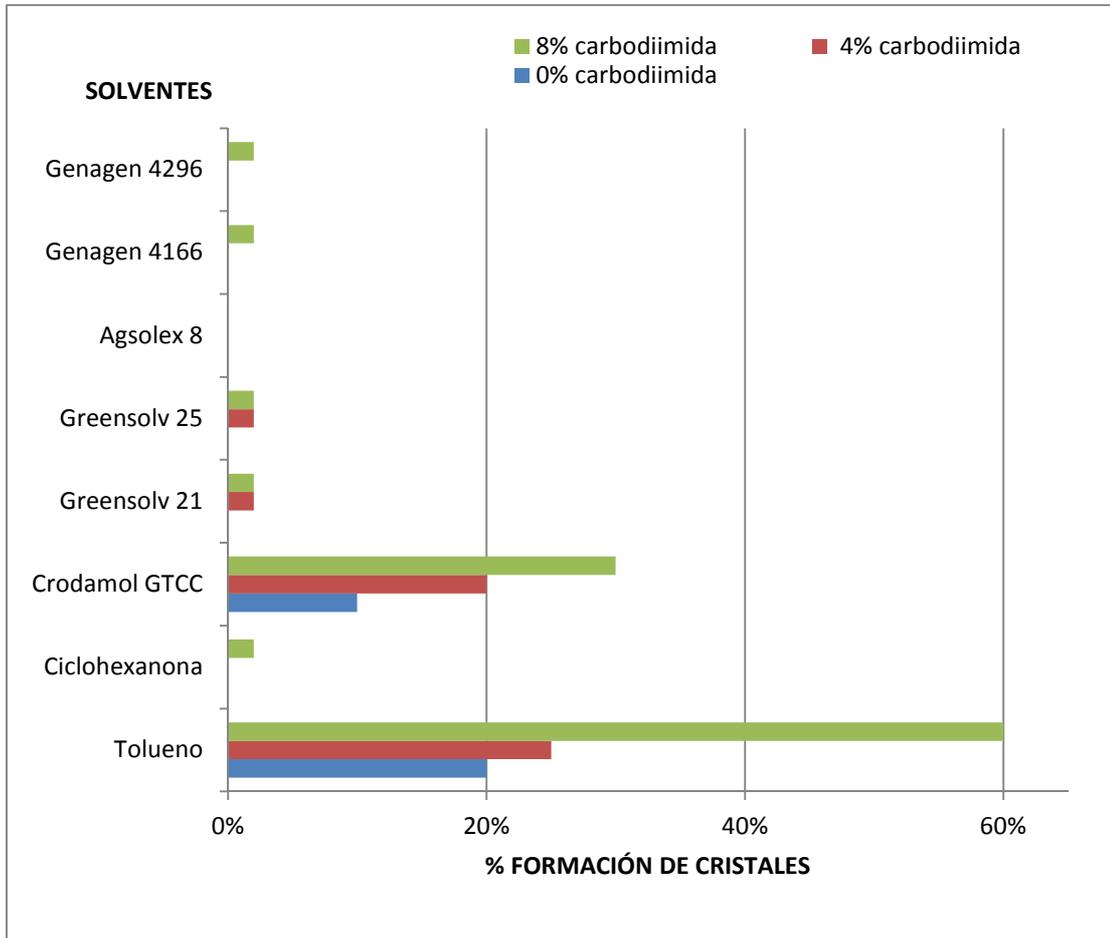
**b) Resultados de envejecimiento en frío a (0+/-1)°C:**

Las muestras que pasaron la estabilidad a temperatura ambiente son las muestras de interés para realizar la estabilidad en frío. A continuación se muestran los resultados obtenidos de la estabilidad a bajas temperaturas ((0+/-1)°C) (tabla 26). La cantidad de cristales observada se ha descrito en porcentaje en base al volumen de cada muestra.

**Tabla 26.** Resultados de Estabilidad a (0+/-1)<sup>o</sup>C. Cipac MT39.3VOL J. (Fuente: Autor)

Código	Solvente	%p/v Carbodiimida	Presencia Cristales	% Re-disolución de cristales
S-1	Tolueno	0%	20%	No se re-disuelven.
S-1-1		4%	25%	No se re-disuelven.
S-1-2		8%	60%	No se re-disuelven.
S-2	Ciclohexanona	0%	0%	-
S-2-1		4%	0%	-
S-2-2		8%	2%	Si se re-disuelven.
S-4	Crodamol GTCC	0%	10%	No se re-disuelven.
S-4-1		4%	20%	No se re-disuelven.
S-4-2		8%	30%	No se re-disuelven.
S-5	Rhodiasolv Green 21	0%	0%	Si se re-disuelven.
S-5-1		4%	2%	Se re-disuelven casi en su totalidad
S-5-2		8%	2%	Se re-disuelven casi en su totalidad
S-6	Rhodiasolv Green 25	0%	0%	-
S-6-1		4%	2%	Se re-disuelven casi en su totalidad
S-6-1		8%	2%	Se re-disuelven casi en su totalidad
S-10	Agsolex 8	0%	0%	-
S-10-1		4%	0%	-
S-10-2		8%	2%	Si se re-disuelven.
S-13	Genagen 4166	0%	0%	-
S-13-1		4%	0%	-
S-13-2		8%	2%	Si se re-disuelven.
S-14	Genagen 4296	0%	0%	-
S-14-1		4%	0%	-
S-14-2		8%	2%	Si se re-disuelven.

**Gráfica 2.** Presencia de cristales luego de 7 días a (0+/-1)°C. (Fuente: Autor)



En los resultados podemos observar que las mezclas con Tolueno y Crodamol GTCC forman la mayor cantidad de cristales, los cristales no se han re-disuelto por lo que es necesario excluirlos de la siguiente etapa de envejecimiento a 54°C. Las muestras que contienen Rhodiasolv Green 21 y 25, luego del reposo por 24 horas, presentaron unos cristales muy pequeños evidentes a contra luz por lo que no se los ha excluido de la siguiente etapa de envejecimiento a 54°C

Las soluciones que han dado mejores resultados se muestran en la Tabla 27, es importante recordar que estas soluciones son concentradas y que a partir de ellas se pueden preparar formulados de diferentes concentraciones.

**Tabla 27.** Mejores resultados de la prueba de Estabilidad a (0+/-1)<sup>o</sup>C. (Fuente: Autor)

SOLVENTE	% p/v carbodiimida			% CRISTALES EN LA SOLUCIÓN
	0%	4%	8%	
Ciclohexanona	0%	0%	2%	
Rhodiasolv Green 21	0%	2%	2%	
Rhodiasolv Green 25	0%	2%	2%	
Agsolex 8	0%	0%	2%	
Genagen 4166	0%	2%	2%	
Genagen 4296	0%	2%	2%	

Los solventes que pasaron la prueba a (0+/-1)<sup>o</sup>C, se consideraron los mejores de la serie. Éstas soluciones son las escogidas para ser sometidas a envejecimiento acelerado a (54+/-1)<sup>o</sup>C.

**c) Resultados de envejecimiento a altas temperaturas (54+/-1)<sup>o</sup>C:**

Las soluciones que cumplieron con la estabilidad a temperatura ambiente y a baja temperatura fueron las únicas que se sometieron a envejecimiento acelerado. El procedimiento se describió en la sección de metodología en base a la norma CIPAC VOL J MT 46.3 En la tabla 28 se observa que todas las muestras no presentaron separaciones de fases y/o precipitados luego de los 14 días a (54+/-1)<sup>o</sup>C. por lo que determinó en ellas el cambio en la coloración de las soluciones antes y después del envejecimiento así como el contenido de Amitraz en las muestras seleccionadas por HPLC.

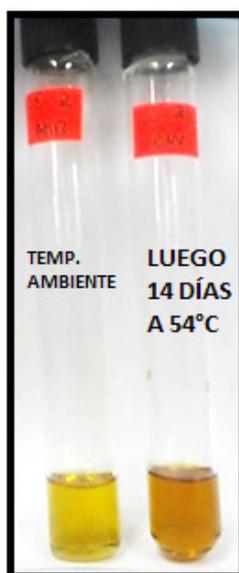
**Tabla 28.** Resultados de Estabilidad a (54+/-1)<sup>o</sup>C. (Fuente: Autor)

Código	Solvente	%p/v Carbodiimida	Separa fases	Presencia de turbidez
S-2	Ciclohexanona	0%	No	No observable
S-2-1		4%	No	No observable
S-2-2		8%	No	No observable
S-5	Rhodiasolv Green 21	0%	No	No observable
S-5-1		4%	No	No observable
S-5-2		8%	No	No observable
S-6	Rhodiasolv Green 25	0%	No	No observable
S-6-1		4%	No	No observable
S-6-1		8%	No	No observable
S-10	Agsorex 8	0%	No	No observable
S-10-1		4%	No	No observable
S-10-2		8%	No	No observable
S-13	Genagen 4166	0%	No	No observable
S-13-1		4%	No	No observable
S-13-2		8%	No	No observable
S-14	Genagen 4296	0%	No	No observable
S-14-1		4%	No	No observable
S-14-2		8%	No	No observable

### 3.3 Resultados de la Determinación cualitativa de la degradación del Amitraz.

En primera instancia se muestran los resultados de la diferencia de color que se ha obtenido entre la muestra envejecida a 54 °C comparada con la muestra a temperatura ambiente. La siguiente ilustración muestra un ejemplo de los tonos que se observaron en las muestras. Se ha añadido al anexo B una serie de fotos de los ensayos.

**Ilustración 18.** Cambio de coloración de los concentrados (Fuente: Autor).



Los resultados obtenidos con el colorímetro se observan en la Tabla 29. En el anexo C se muestran algunos de los reportes de coloración de las soluciones a temperatura ambiente vs envejecidas a  $(54\pm 1)^\circ\text{C}$ , respectivamente.

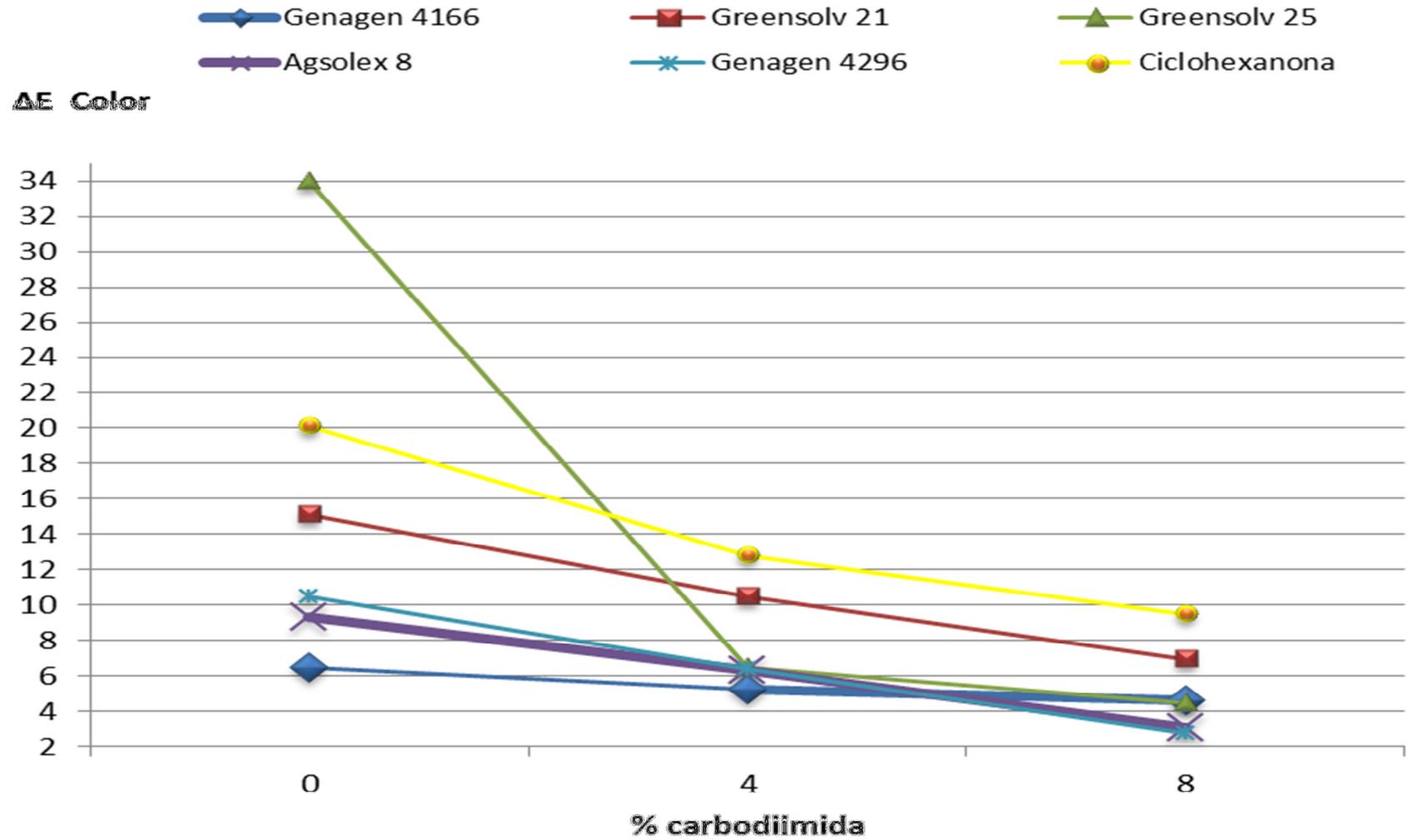
**Tabla 29.** Resultados  $\Delta E$  Color Muestras a Temperatura ambiente vs Muestras envejecidas 14 días a  $(54\pm 1)^\circ\text{C}$  (Fuente: Autor).

Código Muestra	Solvente	% p/v carbodiimida	$\Delta E$ Color
S-2	Ciclohexanona	0%	20.1
S-2-1		4%	12.8
S-2-2		8%	9.5
S-5	Rhodiasolv Green 21	0%	15.1
S-5-1		4%	10.5
S-5-2		8%	6.9
S-6	Rhodiasolv Green 25	0%	34
S-6-1		4%	6.5
S-6-2		8%	4.5
S-10	Agsolex 8	0%	9.3
S-10-1		4%	6.3
S-10-2		8%	3.1
S-13	Genagen 4166	0%	6.5
S-13-1		4%	5.2
S-13-2		8%	4.6
S-14	Genagen 4296	0%	10.5
S-14-1		4%	6.4
S-14-2		8%	2.8

La coloración de las muestras se torna más naranja cuando es sometida a envejecimiento acelerado a 54 °C, la diferencia de color es mayor cuando las muestras no contienen estabilizante (stabaxol I).

En el anexo B y en el C se muestran algunas fotos de las muestras a temperatura ambiente y envejecida donde se observa el cambio de color.

**Gráfica 3.** Gráfica de Color vs %p/v carbodiimida (Fuente: Autor).



### 3.4 Determinación cuantitativa de la degradación del Amitraz.

Se verificó el %p/p de amitraz en cada muestra para conocer el % de degradación. En la Tabla 30, se encuentran los resultados del porcentaje de degradación entre las muestras a temperatura ambiente y envejecida. Se puede observar el %p/p de degradación en cada caso comparada con la diferencia de coloración.

**Tabla 30.** Porcentaje de degradación de las muestras a Temperatura ambiente vs Muestras envejecidas 14 días a (54+/-1)°C (Fuente: Autor).

Código Muestra	Solvente	% p/v carbodiimida	$\Delta E$	% DEGRA
S-2	Ciclohexanona	0%	20.1	74.3
S-2-1	Ciclohexanona	4.16%	12.8	4.2
S-2-2	Ciclohexanona	8.33%	9.5	3.4
S-5	Rhodiaslv Green 21	0%	15.1	55.2
S-5-1		4.16%	10.5	35.4
S-5-2		8.33%	6.9	6.7
S-6	Rhodiaslv Green 25	0%	34	55.9
S-6-1		4.16%	6.5	6.4
S-6-2		8.33%	4.5	0.6
S-10	Agsolex 8	0%	9.3	28.7
S-10-1		4.16%	6.3	17.5
S-10-2		8.33%	3.1	8.4
S-13	Genagen 4166	0%	6.5	24.0
S-13-1		4.16%	5.2	7.5
S-13-2		8.33%	4.6	0.5
S-14	Genagen 4296	0%	10.5	23.4
S-14-1		4.16%	6.4	17.9
S-14-2		8.33%	2.8	12.2

Se observa que existe una tendencia, hacia mayor degradación del amitraz mayor diferencia en la coloración de la muestra. De todos los solventes trabajados, la ciclohexanona presenta mayor degradación si no se le adiciona estabilizante, mientras que el Genagen 4166 y el Genagen 4296 muestran menor degradación, si se compara la coloración de las muestras de ambos productos se observa a simple vista que la muestra envejecida con ciclohexanona da un tono mucho más naranja que las muestras envejecidas de Genagen 4166 y 4296.

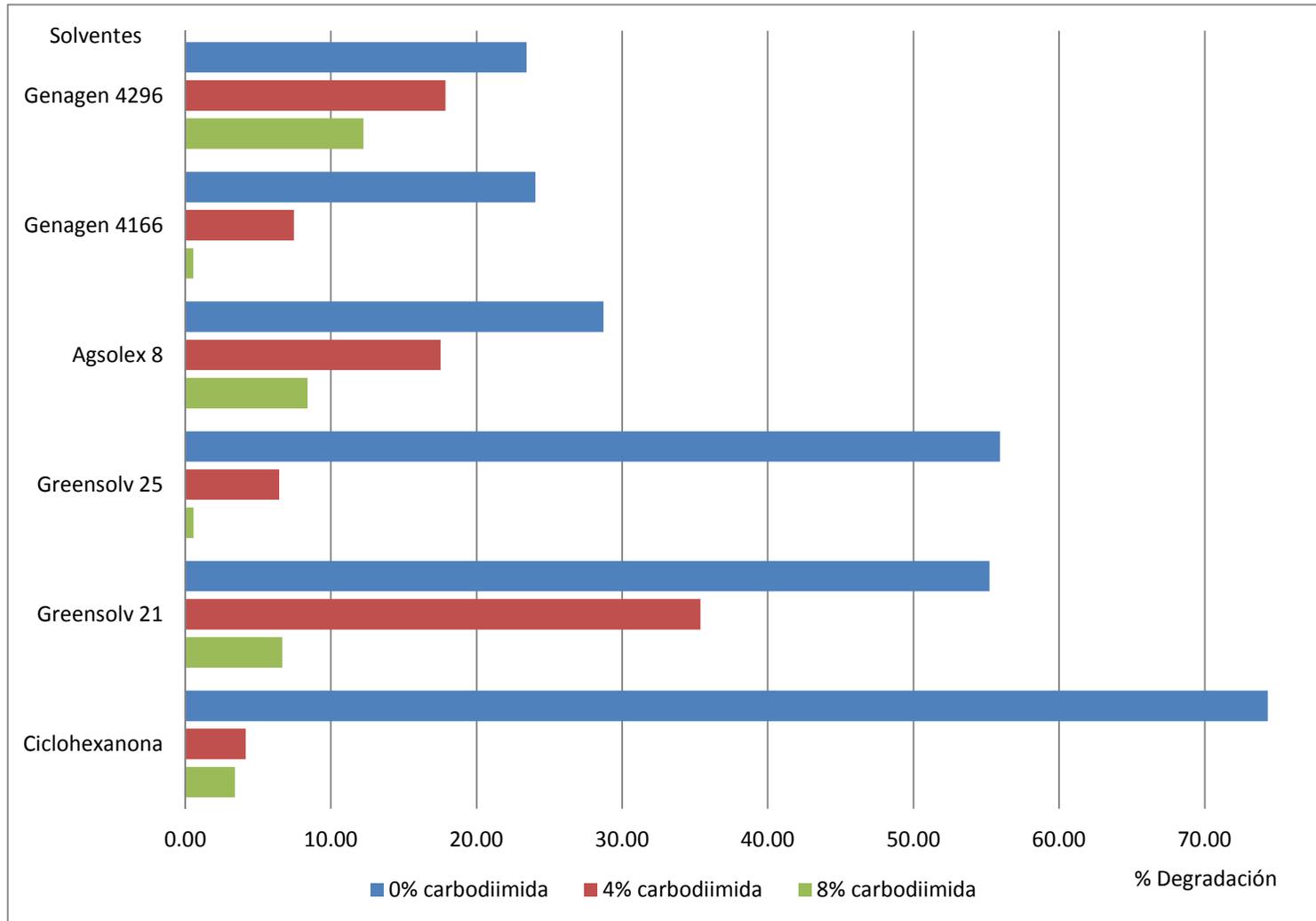
Los solventes que contienen 4%p/v y luego 8%p/v de estabilizante presentan una mejora respecto a las de 0%p/v de estabilizante, la mejora más evidente ocurre con la ciclohexanona con la cual con solo un 4%p/v de carbodiimida reduce su degradación en un 95%, el agregado de un 8%p/v no influye mucho más en la estabilidad de la muestra.

El concentrado hecho con Genagen 4166 presenta también una mejora importante cuando se añade estabilizante, reduciendo la degradación del Amitraz en un 70% (con 4%p/v estabilizante) y casi 100% (con 8%p/v de estabilizante). Situación similar se observa en las mezclas que contienen Rhodiasolv Green 25 y Genagen 4166.

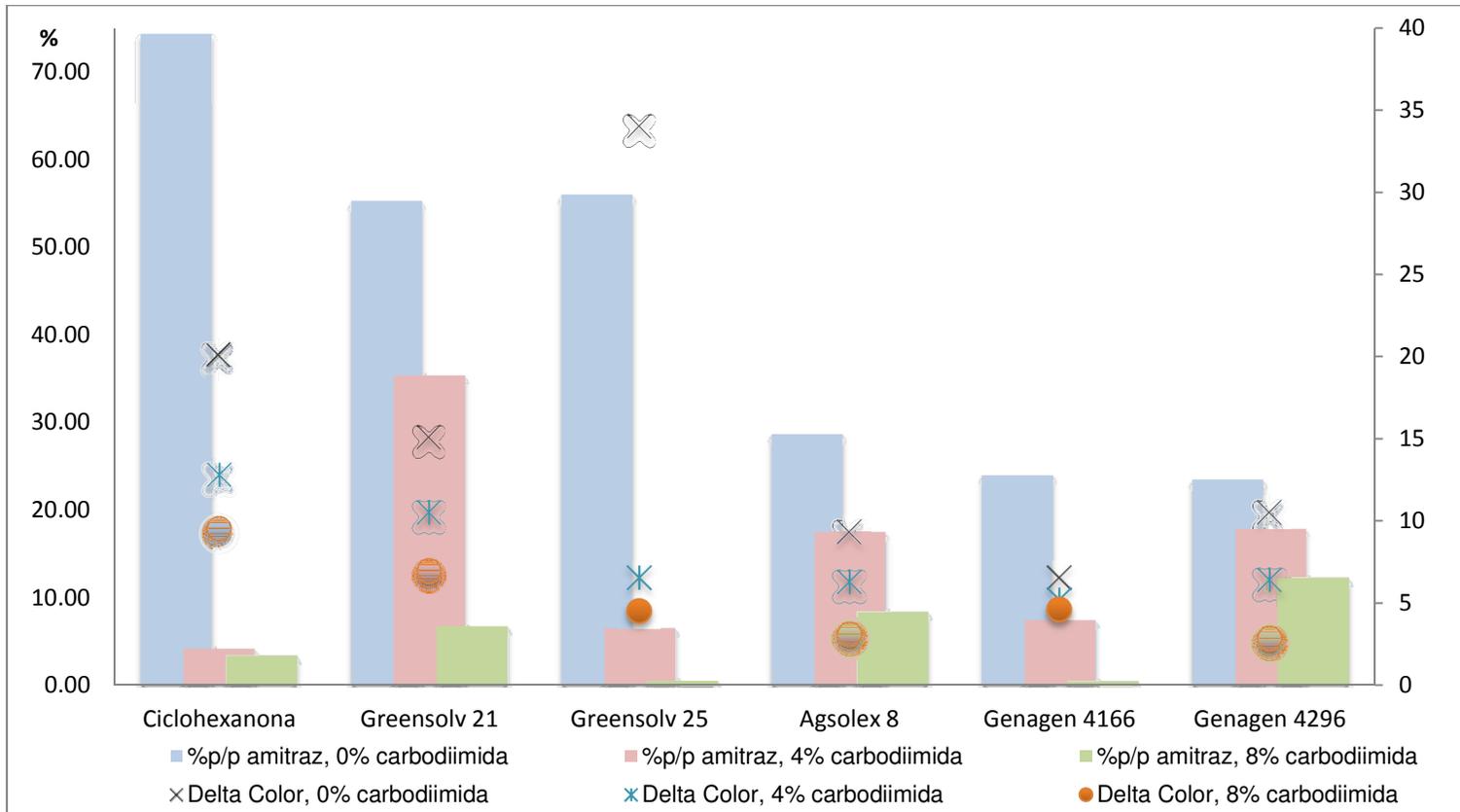
En la gráfica 4 podemos observar la comparación de los resultados de la degradación del amitraz y el solvente usado. Y, en la gráfica 5 se muestra la comparación entre los valores del delta de color y el % de degradación de cada muestra.

En el anexo D se muestran algunos cromatogramas de la cuantificación del amitraz.

**Gráfica 4.** Degradación del amitraz vs solvente utilizado (Fuente: Autor).



**Gráfica 5.** Comparación resultados Degradación Amitraz y Color (54+/-1)°C. (Fuente: Autor)



### **3.5 Resultados de la Selección de los Solventes más Estables que Contienen Amitraz.**

En base a los datos obtenidos se identifica que las soluciones más estables son:

a) Con 0%p/v de estabilizante

Los solventes con menor degradación y coloración en esta categoría son Agsolex 8, Genagen 4166, Genagen 4296.

En segunda instancia están los solventes Rhodiasolv Green 21 y 25 y finalmente con la mayor degradación tenemos al solvente Ciclohexanona.

En esta serie los colores de las soluciones envejecidas son más rojizas respecto a las que contiene 4%p/v y 8%p/v de estabilizante.

b) Con 4%p/v de estabilizante

Adicionando 4%p/v de stabaxol I, se observa que los solventes que se estabilizan más a esa concentración son Ciclohexanona, Rhodiasolv Green 25, Genagen 4166. En segundo lugar se observa mejora en Agsolex 8 y Genagen 4296. El solvente Rhodiasolv Green 21 fue el que presentó mayor degradación de la serie.

c) Con 8%p/v de estabilizante

Con la adición de 8%p/v de stabaxol I, se observa menor degradación en Genagen 4166, Rhodiasolv Green 25, seguidos por ciclohexanona, Rhodiasolv Green 21, Agsolex 8 y finalmente Genagen 4296 con la mayor degradación.

Por lo antes expuesto, las soluciones más estables son las preparadas con Genagen 4166 y Rhodiasolv Green 25, ambas con una concentración de 33%p/v. Éstos solventes son recomendados por su baja toxicidad.



## CAPÍTULO IV

### 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las soluciones concentradas con las cuales se trabajaron, contenían 33%p/v de Amitraz. Aquellas con mayor estabilidad podrían servir de punto de partida para preparar formulaciones que contengan máximo  $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de activo empleado con solventes de baja toxicidad.

Durante la evaluación de la estabilidad de las soluciones de amitraz al 33%p/v, se observó que los solventes Ciclohexanona, Rhodiasolv Green 21, Rhodiasolv Green 25, Agsolex 8, Genagen 4166 y Genagen 4296, mantuvieron al amitraz en solución después de someterlo a  $(0\pm 1)^\circ\text{C}$  mientras que el Tolueno, Solvesso 150, Prifer, y los solventes de la serie Crodamol (AB, GTCC, IPM, IPP), no lo hicieron. Teniendo en cuenta estos resultados, la Ciclohexanona, Rhodiasolv Green 21, Rhodiasolv Green 25, Agsolex 8, Genagen 4166, y Genagen 4296 fueron los solventes elegidos para ser evaluados a  $54^\circ\text{C}$ . Los solventes que no lograron mantener al amitraz en solución al 33% p/v podrían hacerlo si la concentración del activo fuese menor e incluso podrían ser usados como co-solventes para abaratar costos según criterio del formulador. Bajo este razonamiento, se deja abierta la posibilidad de realizar estudios adicionales para evaluar la degradación de amitraz en esos solventes con el fin de tener alternativas de co-solventes.

Considerando la naturaleza, de cada solvente, sus propiedades físicas y químicas y, tomando en cuenta los estudios previos de otros autores, existiría un incremento en la velocidad de degradación cuando el solvente contiene acidez libre. Las soluciones de amitraz que contienen Ciclohexanona, Rhodiasolv Green 21 y Rhodiasolv Green 25 muestran una mayor degradación del activo respecto a las matrices que contienen los solventes Agsolex 8, Genagen 4166 y Genagen 4296. Ésta diferencia en la degradación podría estar relacionada con la estructura y composición de cada solvente. Algunos de los solventes empleados pueden oxidarse o hidrolizarse formando trazas de compuesto acídicos en mayor o menor proporción. Para estudios

complementarios se podría determinar la existencia y tipos de residuos ácidos en cada solvente.

En todos los casos analizados se observa a simple vista, que las soluciones sometidas a envejecimiento acelerado ( $54\pm 1$ ) °C toman una coloración más naranja respecto a la muestra conservada a temperatura ambiente, las cuales tienen un tono amarillo claro. Se comprobó que esa diferencia de color es un indicativo de la degradación del amitraz en la solución pues, mientras más colorida es la solución mayor degradación presentará el activo. Por lo tanto, la medición de color permitiría establecer un método alternativo al HPLC para determinar el rango de degradación del amitraz a través del uso de un colorímetro marca Lovibond.

Cuando se prepararon soluciones de amitraz con carbodiimida se observaron mejoras en la estabilidad de las soluciones. A mayor cantidad de Stabaxol I (carbodiimida polimérica) existe menor degradación. De esta manera, se comprueba lo que estudios previos habían mencionado sobre la estabilidad del amitraz. La ciclohexanona es un ejemplo de ello, pues, pasa de tener un 74% de degradación (sin agregado de estabilizante) a un 4% y a un 3% cuando se añade 4%p/v y 8%p/v de carbodiimida respectivamente. En otros casos, como el Genagen 4166 pasa de un 24%, sin estabilizante, a un 7% y a 1% de degradación. Los resultados nos sugieren, nuevamente, que la menor degradación obtenida del activo Amitraz en un formulado que contiene estabilizante estaría dada por la composición química de cada solvente, y que las cantidades de Stabaxol I a emplear para lograr la degradación mínima dependerán de los mismos. Respecto a la coloración, estas muestras también presentaron tonos más rojizos luego de ser sometidas a envejecimiento acelerado a ( $54\pm 1$ ) °C comparadas con las muestras reservadas a temperatura ambiente, al mismo tiempo, este tono rojizo es mucho menos intenso a mayor cantidad de Stabaxol I en la solución. Al comparar los resultados de degradación de amitraz y el cambio de color se observa que existe una relación entre la degradación del Amitraz y la coloración de la solución, a mayor coloración se observa mayor degradación. El uso del colorímetro permitió evidenciar diferencias de color entre cada muestra que ya no eran percibidas por el ojo humano.

En resumen, los solventes donde el Amitraz se mantiene más estable son Rhodiasolv Green 25, Genagen 4166, Rhodiasolv Green 21, Genagen 4296, de los cuales todos tienen la ventaja de ser menos tóxicos beneficiando al medio ambiente, al formulador y al usuario de los productos. Éstos solventes podrían ser utilizados para preparar formulados de amitraz como concentrado emulsionable y/o microemulsionable.

Es importante indicar que el producto que se formule con estos solventes deberá evaluarse bajo los parámetros de estabilidad a 0°C, a 54°C y el porcentaje de degradación del activo con el fin de ajustar el contenido de carbodiimida y verificar que el producto cumpla con la normativa considerando que las concentraciones finales de amitraz variarían a juicio del formulador.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC)-censo nacional agropecuario 2000, de [http://www.inec.gob.ec/estadisticas/?option=com\\_content&view=article&id=111&Itemid=126](http://www.inec.gob.ec/estadisticas/?option=com_content&view=article&id=111&Itemid=126)
2. S. Romero, J. Camacho, Análisis del aprovechamiento del Ecuador como miembro de la comunidad andina en el sector agropecuario desde el 2000 al 2006, (2007) 100-200.
3. G. Miño, F. Falconí, R. Vinueza, Estudio sobre la presencia de miasis en ganaderías del Ecuador, (2005) 15-17.
4. Ramesh G. Gupta, Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles, 2012 (599-610)
5. Tomlin. The Pesticides Manual, 15th ed, 2009
6. I.R Harrison, K. Antonin, J.F. McCarthy. 1,3,5-Triazapenta-1,4-dienes: Chemical Aspects of a New Group of Pesticides. (1973) 901-910.
7. Hollinworth, Duclos, Estrada Peña, Ascher, 1999
8. D.M Weighton, J.C. Kerr, J.T. McCarthy, Amitraz- a novel acaricide with selective insecticidal properties. Proceedings 7th British Insecticide and Fungicide Conference., British Crop Protection Council 2 (1973) 703.
9. P.D. Lingren, D.A. Wolfenbarger, J.B. Nosky Response of *Campoletis perdistinctus* and *Apanteles marginiventris* to insecticides. Journal of Economic Entomology (1972) 1295-1299.
10. P.H. Westgard, L.E. Estigar, L.E. Mendinger. Field evaluation of pesticides for their suitability in an integrated program for spider mites on pear. Journal of Economic Entomology (1972) 191-192.
11. EPA, 1996. United States, Environmental protection Agency Office of Pesticide Programs States Prevention. Pesticides EPA-738-F-96-031 Agency (7508W). United States.
12. R. D. Brimecombe † and J. L. Limson. 2006. "Electrochemical Investigation of the Effect of pH and Solvent on Amitraz Stability", J. Agric. Food Chem 54. Rhodes University, pag 8139–8143.
13. M. Charmaine Van Eeden, Wilna Liebenberga, Jan L. du Preeza & Melgardt M. de Villiersb 2012. Solvent and Surfactant Enhanced Solubilization, Stabilization, and Degradation of Amitraz. Pages 33-51.

14. S. Kolazi, Narayanam, Domingo I. Jon and George Beestman. 2006. Use of carbodiimides as Stabilizing Agents to Deliver Water- Labile Active Ingredient in Liquid Systems Including Aqueous Medium- Amitraz as a Case Study. Journal of ASTM International, Vol 3. No. 2, paper ID JAI12912.
15. I. Domingo, Donald Prettypaul, Matthew Benning, Kolazi Narayanan, Robert Ianniello, 1998, Water Dilutable, microemulsion concentrate and pour on formulations International Application Number: CT/US98/21433.
16. M. W Dryden, Ectoparasiticidas usados en Pequeños Animales: Ectoparasiticidas, 2012, Merck Veterinary Manual: [www.merckmanuals.com/vet/pharmacology/ectoparasiticidas/ectoparasiticidas\\_used\\_in\\_small\\_animals.html?qt=amit\(2006\)raz&alt=sh](http://www.merckmanuals.com/vet/pharmacology/ectoparasiticidas/ectoparasiticidas_used_in_small_animals.html?qt=amit(2006)raz&alt=sh)
17. J. Nolan, Current Development in resistance to amidine and pyrethroids in Australia. (1981) 20-30.
18. Noelia Victoria Bendeck Meléndez, Nov 2012. Universidad Zamorano, Departamento de Ciencia y producción Agropecuaria, Zamorano. Evaluación de Beauveria bassiana y metarhiziumanisopliae para el control de Boophilus microplus en vacas del hato lechero de Zamorano, Honduras.
19. Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad en el Agro (Agrocalidad), Productos veterinarios, Octubre 2014. [http://agrocalidad.gob.ec/ProductosVeterinarios/regino\\_producto\\_veterinario.php](http://agrocalidad.gob.ec/ProductosVeterinarios/regino_producto_veterinario.php)
20. Registro Oficial No. 257, 01 de Febrero 2001. Decisión 483 de la Comunidad Andina de Naciones Normas de registros, control, comercialización de productos Veterinarios publicada en Registro Oficial, art. 60.
21. IUPAC. Recommendations on Nomenclature for Chromatography, Pure Appl Chem., (1993) 65, 819–872
22. Norma Andina de formulaciones.
23. CRODA, Guides Formulations, de <https://crop.crodadirect.com/home.aspx?d=content&s=144&r=297&p=3285>.
24. Alan Knowles, 2006, Editorial Agro Reports, Adjuvants and additives, London. Pag 15-18, 65-70.

25. Yuri Kazakevich, Hplc for pharmaceutical scientists, (2007) 9.
26. IUPAC. Recommendations on Nomenclature for Chromatography, Pure Appl Chem., (1993) 65, 819–872.
27. Douglas A. Skoog, Thomson. Química Analítica, (2005) página 986.
28. Lovibond & Tintometer. 2013. Luminosidad (Entendiendo la comunicación del color), England.
29. APVM Veterinary Guideline. Guidelines for the Generation of Storage Stability Data of Veterinary Chemical Products, No. 68, AUSTRALIA (2006).
30. W. Dobrat, A. Martijn. CIPAC Handbook Volume J. Analysis of Technical and Formulated Pesticides. Collaborative International Pesticides Analytical Council Ltd, 2000.
31. Alan Knowles, New Developments in Crop Protection Product Formulation, (2005) Pag 23-33.
32. Environmental Protection Agency, Base de Datos Integrated Risk Information System (IRIS), Toxicological review of toluene (EPA/635/R-05/004) <http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0118tr.pdf>, (30 marzo 2015)
33. Environmental Protection Agency, Electronic Code Of Federal Regulations Title 40: Protection of Environment Chapter I Subchapter E Part 180 Subpart D §180.930, [http://ecfr.gpoaccess.gov/cgi-bin/text-idx?SID=edcc9cf1dba8700ad5acf36d5d1585ea&node=se40.24.180\\_1930&rgn=div8](http://ecfr.gpoaccess.gov/cgi-bin/text-idx?SID=edcc9cf1dba8700ad5acf36d5d1585ea&node=se40.24.180_1930&rgn=div8), (30 marzo 2015)
34. Environmental Protection Agency, Base de Datos Integrated Risk Information System (IRIS), <http://www.epa.gov/iris/subst/0219.htm>. (30 marzo 2015)
35. Nelson KW, Ege JF, Ross M, Woodman LE, Silverman L [1943]. Sensory response to certain industrial solvent vapors. J Ind Hyg Toxicol 25(7):282-285.

## GLOSARIO

**Absorbancia:** Medida de la atenuación de una radiación al atravesar una sustancia, que se expresa como el logaritmo de la relación entre la intensidad saliente y la entrante.

**Concentración letal media (LC50):** es la concentración que resulta letal para el 50% de una especie expuesto durante un período específico. Se usa generalmente para ensayos químicos como la oxidación / reducción u otros ensayos colorimétricos / fluorimétrica donde una concentración química inhibe el 50 % de estos procesos (incluso para mediciones UFC por inhibición del crecimiento bacteriano). Los valores LC usualmente se refieren a la concentración de un químico pero en estudios ambientales también puede significar la concentración de un químico en agua.

**Dosis letal media (LD50):** es la cantidad de un material determinado completo de una sola vez, que provoca la muerte del 50% (una mitad) de un grupo de animales de prueba. El LD50 es una forma de medir el envenenamiento potencial a corto plazo (toxicidad aguda) de un material.

**Emulsión:** mezcla de dos líquidos inmiscibles de manera más o menos homogénea.

**Microemulsión:** Dispersión hecha de agua, aceite y surfactante ( s) que es un sistema isotrópico y termodinámicamente estable con un diámetro de tamaño de gota dominio aproximadamente de 1 a 100 nm, normalmente de 10 a 50 nm.

**Formamidina:** conocidas también como amidinas, son un tipo especial de sustancias activas ectoparasiticidas con actividad de contacto sobre todo contra garrapatas, ácaros y piojos.

**Intoxicación aguda:** consiste en la aparición de un cuadro clínico patológico después de exposición única o múltiple, en un periodo inferior a 24 horas.

**Intoxicación crónica (a largo plazo):** consiste en la aparición de un cuadro patológico como consecuencia de exposiciones frecuentes o repetidas (generalmente bajas dosis) después de un largo periodo de tiempo (años).

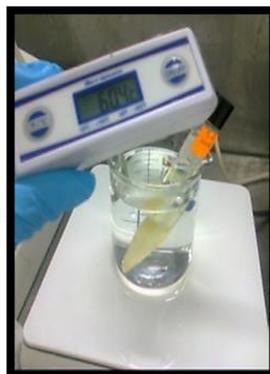
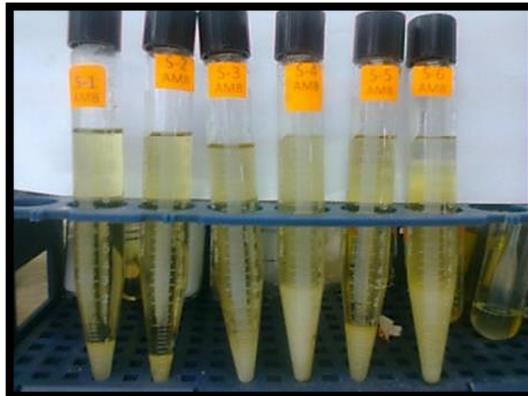
**Nivel sin efecto adverso observable (NOAEL, NOEL (en sus siglas inglesas)):** Es la dosis más elevada de una sustancia que no ha mostrado en las pruebas tener efectos perjudiciales para la salud en personas o animales.

**Tensoactivo:** llamado también surfactante, es una sustancia que influye en la tensión superficial de contacto entre dos fases.

## **ANEXOS**

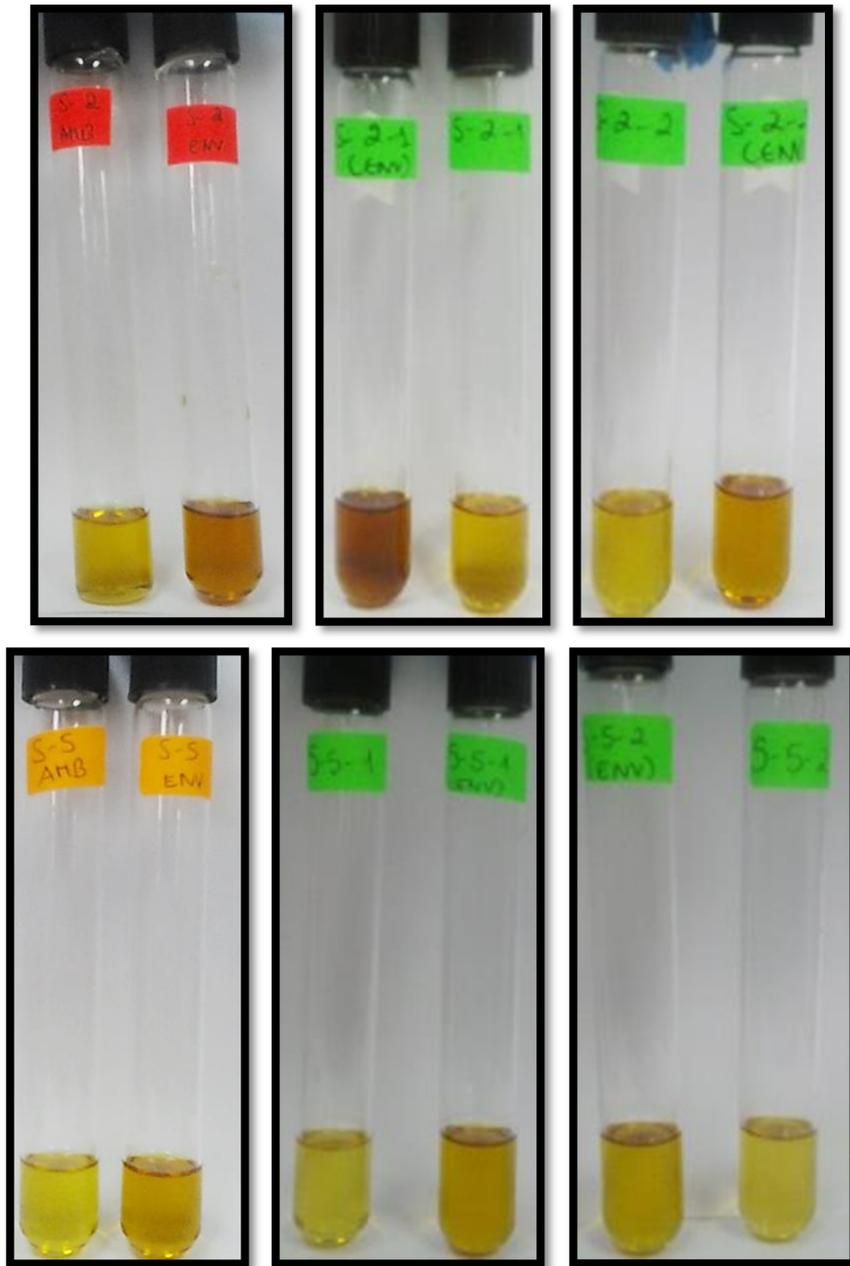
# Anexo A

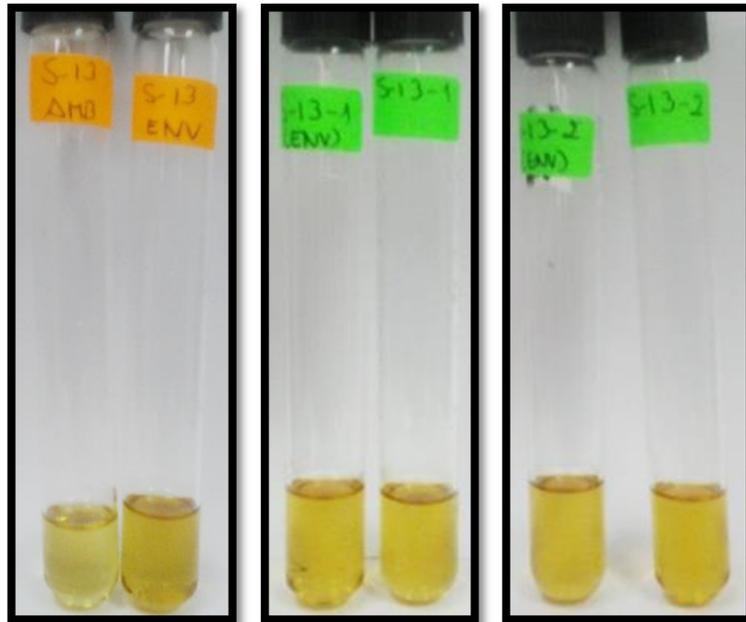
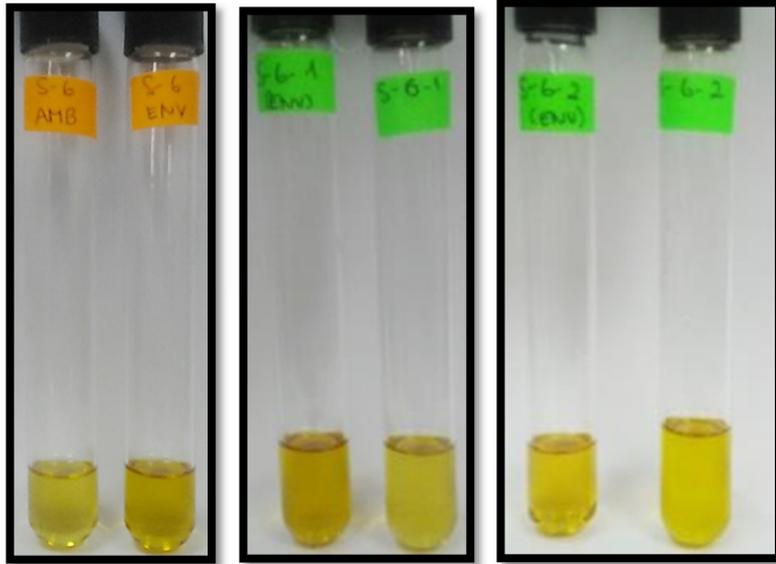
Elaboración de las muestras a analizar.



## Anexo B

En las siguientes fotos podemos apreciar la evidencia del cambio de coloración en las muestra sometidas envejecimiento acelerado.





# Anexo C



## RM200QC COLOR SAMPLE REPORT

Report Date: 19.07.2013 Tolerance Type: CMC(2:1) D65 10°	Device S/N: 2010001200 Limit: 1.0
---	--------------------------------------

Standard	Date & Time	L*	a*	b*	C*	h°	Pass Rate	ΔE Average
S-2	05.07.2013 12:34:49	55.2	-0.1	42.8	42.8	90.1	0.0%	20.1

Sample	Date & Time	ΔL*	Δa*	Δb*	ΔC*	ΔH*	ΔE*	P/F	Strength (tristim.)	stain	Gray Scale color
S-2 ENV 54C	19.07.2013 15:46:14	-30.3	24.6	-5.1	2.2	25.1	22.2	Fail	2193 %	1	1

Standard	Date & Time	L*	a*	b*	C*	h°	Pass Rate	ΔE Average
S-2-1	23.09.2013 16:19:42	50.4	12.7	61.8	63.1	78.4	0.0%	12.8

Sample	Date & Time	ΔL*	Δa*	Δb*	ΔC*	ΔH*	ΔE*	P/F	Strength (tristim.)	stain	Gray Scale color
Sample 1	23.09.2013 16:21:52	-25.7	13.2	-25.9	-18.8	22.1	20.1	Fail	440 %	1-2	1

Standard	Date & Time	L*	a*	b*	C*	h°	Pass Rate	ΔE Average
S-2-2	23.09.2013 16:24:09	52.2	9.1	62.7	63.3	81.7	0.0%	9.5

Sample	Date & Time	ΔL*	Δa*	Δb*	ΔC*	ΔH*	ΔE*	P/F	Strength (tristim.)	stain	Gray Scale color
Sample 1	23.09.2013 16:25:44	-9.9	13.2	0.4	3.6	12.7	9.5	Fail	334 %	2-3	1

Report Date: 08.04.2014 Tolerance Type: CMC(2:1) D65 10°	Device S/N: 2010001200 Limit: 8.0
---	--------------------------------------

Standard	Date & Time	L*	a*	b*	C*	h°	Pass Rate	ΔE Average
S-14	07.04.2014 10:17:39	47.0	2.7	35.5	35.6	85.7	0.0%	10.5

Sample	Date & Time	ΔL*	Δa*	Δb*	ΔC*	ΔH*	ΔE*	P/F	Strength (tristim.)	stain	Gray Scale color
Sample 1	07.04.2014 10:19:33	-0.8	10.1	18.0	19.4	7.1	10.5	Fail	268 %	2-3	1

Standard	Date & Time	L*	a*	b*	C*	h°	Pass Rate	ΔE Average
S-14-1	07.04.2014 10:08:44	51.5	4.3	40.1	40.3	83.8	100.0%	6.4

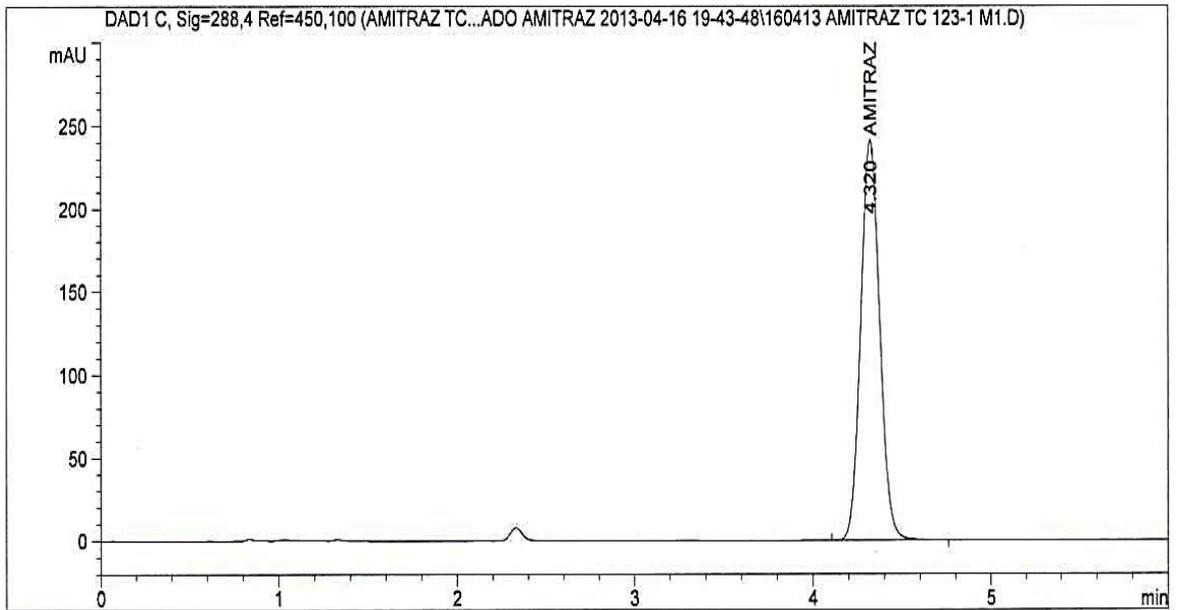
Sample	Date & Time	ΔL*	Δa*	Δb*	ΔC*	ΔH*	ΔE*	P/F	Strength (tristim.)	stain	Gray Scale color
Sample 1	07.04.2014 10:10:54	-4.1	6.3	10.8	11.7	4.5	6.4	Pass	239 %	3	1-2

Standard	Date & Time	L*	a*	b*	C*	h°	Pass Rate	ΔE Average
S-14-2	07.04.2014 10:06:17	52.2	2.8	36.8	36.9	85.6	100.0%	2.8

Sample	Date & Time	ΔL*	Δa*	Δb*	ΔC*	ΔH*	ΔE*	P/F	Strength (tristim.)	stain	Gray Scale color
Sample 1	07.04.2014 10:15:27	-2.6	1.4	5.4	5.5	1.0	2.8	Pass	155 %	4	2-3

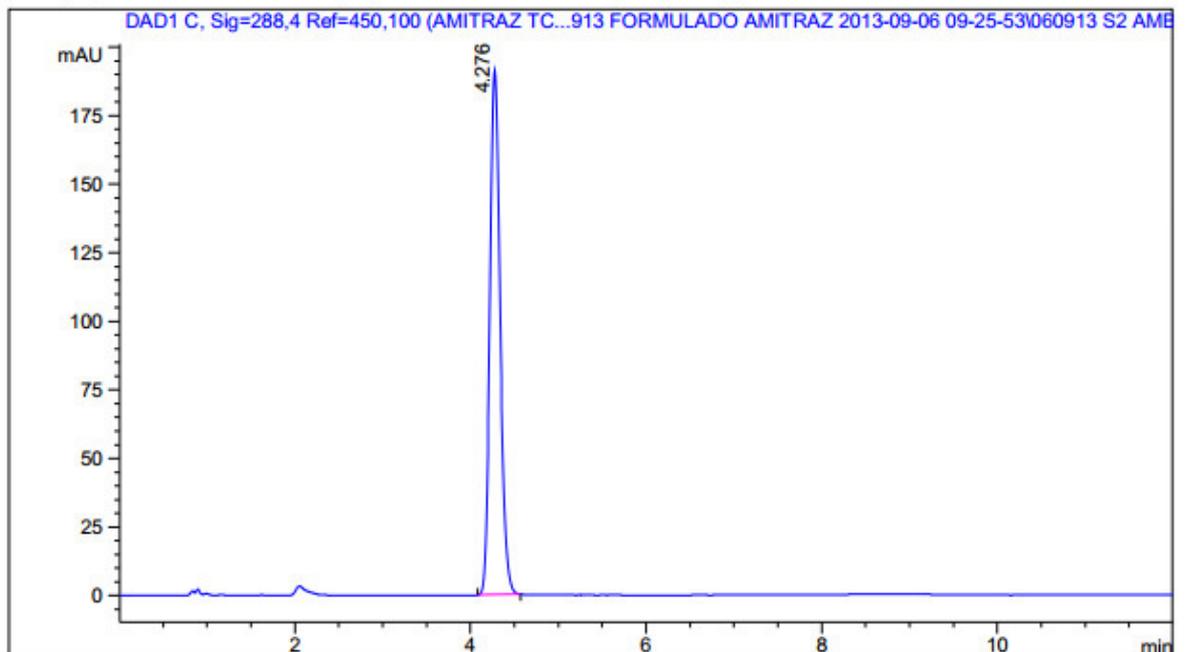
# Anexo D

## CROMATOGRAMA INGREDIENTE ACTIVO



## CROMATOGRAMA SOLUCIÓN AMITRAZ A TEMPERATURA AMBIENTE

METODO PARA DETERMINACION DE AMITRAZ FORMULADOS



**CROMATOGRAMA SOLUCIÓN AMITRAZ LUEGO DE ENVEJECIMIENTO A 54°C.**

METODO PARA DETERMINACION DE AMITRAZ FORMULADOS

