



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**“DETERMINACION DE COMPUESTOS COCCIDIOS-
TATICOS EN PREMEZCLAS DE ALIMENTO
PARA AVES”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

GEORGINA MARGARITA MAYA RUIZ

MEXICO, D. F.,

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

INTRODUCCION	1
PARTE TEORICA	2
PARTE EXPERIMENTAL	37
CONCLUSIONES	71
BIBLIOGRAFIA	73

I INTRODUCCION

La coccidiosis aviar es una enfermedad parasitaria causada por diferentes especies de protozoarios pertenecientes al género *Eimeria*. La repercusión que tiene dentro de la industria avícola es considerable ya que según el cuadro de patogenicidad presente producen retardo en el crecimiento, disminución del apetito, mala absorción alimenticia, además de la gran mortandad en aves; todo esto tiene como consecuencia grandes pérdidas económicas, por tanto, la prevención contra la coccidiosis es uno de los aspectos sanitarios de mayor relevancia en la producción de pollos de engorda, pollas de reposición o reproductoras en piso, destacando el papel que los fármacos anticoccidianos juegan en tal protección.

El objetivo principal de ésta tesis es el desarrollo de un método rápido y sencillo para la determinación cuantitativa, además del estudio estadístico para verificar la reproducibilidad, especificidad y eficacia del método con el fin de lograr un control de calidad eficiente de dos principios activos que actúan como anticoccidianos: la 3,5 dinitro o-toluamida y la p-amino bencensulfonil guanidina presentes en una premezcla que se emplea en Medicina Veterinaria y que garantiza la salud de las aves asegurando al avicultor una rentabilidad superior por medio de un control efectivo y seguro de la coccidiosis.

Asimismo, el presente trabajo contiene una información general del principal fármaco: la 3,5 dinitro o-toluamida y una amplia información bibliográfica acerca de él, que puede servir como punto de partida para efectuar otras investigaciones en este campo tan importante dentro de nuestra economía Nacional.

II PARTE TEORICA

Coccidiosis, es la designación general que se aplica a la infección causada por una o varias especies de él género Eimeria, del orden Coccidiida, subclase Coccidiomorpha, de la clase de los Sporozoa, del phylum Protozoa. Los parásitos que pertenecen al orden Coccidiida son llamados comúnmente "coccidias" (1).

Las coccidias son parásitos endocelulares de forma ovoidal, cilíndrica, piriforme o esférica, se localizan en el aparato digestivo de las aves, en epitelios y endotelios de la pared intestinal, rara vez invaden hígado, riñones, molleja, etc.. Las fases evolutivas en el ciclo de la coccidias son endógenas y exógenas, los esporozoitos infestan al huésped y dan lugar a los trofozoitos, éstos al dividir su núcleo realizan la reproducción asexual: la esquizogonia. En las células huésped están presentes los esquizontes que liberan a los merozoitos y éstos a su vez forman los gametocitos para que se efectue el desarrollo sexual del parásito: la gametogonia; cumpliéndose así el ciclo de vida, la esporogonia ocurre fuera del huésped (1) (2) (3).

Las aves adquieren la infección al ingerir oocistos esporulados que se encuentran en el alimento, agua y lugar donde habitan (1) (4). Los efectos del contagio varían según la especie de Eimeria, ya que se sabe, que E. tenella, E. necatrix y E. acervulina, son más patógenas que E. maxima, E. -

brunetti y E. hagani, y otras más de las cuales, el cuadro de patogenicidad es casi nulo como E. praecox y E. mitis (1). También, se modifica la respuesta, con la especie, edad, nutrición y resistencia del huésped, y con el grado de infestación y las condiciones ambientales (5).

Se ha comprobado, que si un ave ingiere una mínima cantidad de oocistos no se presentan signos de infección, si se repite el contacto, la misma infección puede inmunizar al ave y solamente con la ingestión de grandes cantidades de oocistos se provoca una enfermedad severa produciendo mortandad (6); por esto, la coccidiosis en aves domésticas ha estado sujeta a intensos estudios para conocer ciclos de vida, fisiología, patogenicidad, inmunidad y terapia de las coccidias y el manejo y saneamiento de las granjas (1).

En las condiciones ordinarias que prevalecen en las granjas, la mayor parte de los ataques de coccidiosis ocurren durante los meses lluviosos de mayo, junio, julio y agosto (4). Las coccidias pueden causar daños severos e incluso muertes durante el desarrollo de su ciclo evolutivo, los síntomas exteriores en las aves de corral son: decaimiento, cuello encogido, alas caídas, el plumaje erizado, falta de apetito, anemia, palidez en la piel, cresta y tarsos, las deyecciones son líquidas y con determinadas especies de Eimeria se presentan hemorragias (1).

Las características morfológicas de las coccidias se emplean para diferenciar las especies de las mismas, los oocistos de algunas especies se identifican por su tamaño,

forma y color. Se distinguen también por la región del tracto intestinal que invaden y la apariencia macroscópica que presentan las lesiones según los estados del ciclo de vida de las coccidias, al realizar la necropsia (1). Además, se ha observado que hay variaciones en la habilidad de las diferentes especies de Eimeria para producir oocistos, ya que a veces ocurre que aves con una infección ligera pueden eliminarlos en grandes cantidades.

Las aves que se han inmunizado a una especie de Eimeria son susceptibles a todas las demás, por tanto, se utilizan pruebas de inmunidad cruzada para determinar las especies de coccidias de un huésped particular (6).

Los informes que se tienen de los gastos ocasionados por las enfermedades coccidiales provienen de países industrializados, en todos los estudios se informa de un elevado predominio de éstas. En Estados Unidos por ejemplo la pérdida anual alcanza los 100 millones de dólares sin contar que la mayor merma se debe a los pollos de engorda, porque se espera a que desarrollen hasta un peso de venta (7). También se sabe que la coccidiosis inhibe la absorción normal de las vitaminas A y D causando una mala pigmentación en las aves lo que repercute en un bajo valor de éstos animales (8).

Después de varios estudios se ha llegado a la conclusión de que las infecciones con una sola especie de coccidia son raras, las epidemias que prevalecen se deben a varias especies (4).

Es sumamente complicado en condiciones de granja, prevenir a los pollos de la ingestión de oocistos, ya que éstos pueden permanecer vivos en la tierra cerca de un año ó más (1). La prevención de la coccidiosis depende de evitar una infección fuerte que cause enfermedad, el permitir un contagio insignificante produce inmunización en las aves (6).

Asimismo, es necesario un método de cría de animales domésticos, con manejo y saneamiento eficaces, además del uso de fármacos anticoccidianos en alimentos y agua que ayudan a contrarrestar epidemias en forma muy eficiente.

Por consiguiente, en la actualidad la nutrición avícola requiere de complementos heterogéneos para optimizar la producción y evitar infestaciones, lo que se traduce en ganancias para el avicultor (9).

Los alimentos que contienen 3,5 dinitro o-toluamida se usan en la prevención y control de coccidiosis en pollos (10) (11) (12), pruebas de seguridad indican que no afectan la producción de huevos (en número y peso) (13) y la calidad o fertilidad de las mismas aves (10) (14), su concentración como aditivo en premezclas generalmente es de 25% y en alimentos para aves se encuentra entre 0.0063% y 0.0125%.

Debido a que algunas veces el alimento con 3,5 dinitro o-toluamida se mezcla con antibióticos (11), Bevirt y Thiegs (10) realizaron un estudio para determinar si la adición independiente de: penicilina procaínica, aureomicina, sal de manganeso de la bacitracina, sal de zinc de la bacitracina, oleandomicina, tiocianato de eritromicina y terrami-

cina, en dosis normales tenían algún efecto en los residuos de la 3,5 dinitro o-toluamida o en su metabolito principal la 3 amino 5 nitro o-toluamida (ANOT).

La investigación se efectuó en tejido muscular e hígado de pollos: los residuos hallados en pollos tratados con alimento adicionado de 3,5 dinitro o-toluamida y antibióticos fueron esencialmente los mismos que los residuos obtenidos en pollos tratados con alimento adicionado de 3,5 dinitro o-toluamida únicamente, es decir, después de administrar una dieta con 3,5 dinitro o-toluamida y antibióticos durante 8 semanas éstos últimos no causaron ninguna variación en los residuos.

Además, el residuo combinado de 3,5 dinitro o-toluamida y 3 amino 5 nitro o-toluamida para cada tejido demostró que: cuando más 3,5 dinitro o-toluamida es metabolizado el residuo de 3 amino 5 nitro o-toluamida es mayor y viceversa.

Asimismo, es importante conocer el modo de acción de los fármacos, por tanto, es necesario distinguir los estados de desarrollo, del parásito, afectados por el fármaco, la naturaleza del daño y las condiciones bajo las cuales se pueden observar los efectos. Para obtener información útil se recurre a experimentos controlados con pollos a los que se les induce la infección, se les trata con el fármaco en estudio y posteriormente con técnicas in vitro se hacen observaciones directas sobre los parásitos para ver los cambios morfológicos debidos al tratamiento.

En un estudio efectuado por Dougald y Galloway (15) se

usaron técnicas in vivo e in vitro para conocer los efectos de fármacos anticoccidianos (monensina, robenidina, 3,5 dinitro o-toluamida, nicarbazina y decoquinato) sobre:

1. viabilidad de esporozoitos extracelulares.
2. penetración de los esporozoitos a las células huésped.
3. supervivencia de los esporozoitos intracelulares después de 24 horas de la inoculación.

1. Para estudiar la respuesta de 3,5 dinitro o-toluamida en la viabilidad de esporozoitos extracelulares, se empleó un cultivo de esporozoitos tratado con 3,5 dinitro o-toluamida en dosis de 100 mcg/ml durante 18 horas, esta suspensión se dividió en alicuotas y se les inoculó a un grupo de pollos, se recolectó el material fecal de los 7 días a los 10 días post-infección y se determinó la producción de oocistos de esos días usando una cámara de conteo Mc. Master, se observó que el tratamiento con fármaco no tuvo efecto en la producción de oocistos comparado con un grupo de pollos alimentados con esporozoitos sin tratamiento con 3,5 dinitro o-toluamida.

2. Para analizar la eficiencia del fármaco en la penetración de esporozoitos a las células huésped, se utilizó un cultivo de esporozoitos tratado con 3,5 dinitro o-toluamida (20 mcg/ml) y un control que se incubaron durante 4 horas; los esporozoitos extracelulares se removieron con lavados de solución salina y los esporozoitos intracelulares se contaron en un microscopio de contraste de fases para tener un promedio.

Los cultivos tratados con 3,5 dinitro o-toluamida tienen un número similar de esporozoitos a los del control, por tanto, se deduce que el fármaco no tiene influencia en la capacidad de los esporozoitos para penetrar a las células susceptibles, además, éstos aparecen morfológicamente normales.

3. Para conocer el efecto del fármaco en la supervivencia de esporozoitos intracelulares después de 24 horas de la inoculación, la prueba se realizó en forma similar a la anterior, excepto que los cultivos se incubaron durante 24 horas, los esporozoitos se contaron y se encontró una reducción significativa en su número comparados con el control, aunque no se observaron cambios morfológicos.

El tiempo preciso y los efectos morfológicos de la 3,5 dinitro o-toluamida no se han estudiado como en otros fármacos, pero se supone que éste interfiere en la maduración de la primera generación merozoita al tercer día post-infección.

A fin de constatar la eficacia de los fármacos útiles en la prevención de la coccidiosis, Morrison y Ferguson (16) la indujeron experimentalmente en pollos de 4 semanas de edad que se dividieron en grupos e inocularon con una mezcla de 4 especies de Eimeria: E. acervulina, E. tenella, E. maxima y E. necatrix, luego, se trataron con los siguientes fármacos anticoccidianos:

3,5 dinitro o-toluamida (3,5 DOT) al 0.0125%

buquinolato (BA) al 0.0055%, 0.00825%, 0.0125%

amprolium + etopabato (AE) al 0.025% y 0.0125%
amprolium + etopabato + sulfaquinoxalina (AES) en proporción 0.0008% : 0.0005% : 0.0006%.

Para cuantificar la acción de los fármacos anticoccidíanos se procedió a determinar un índice anticoccidial que es igual, al por ciento de sobrevivientes más el por ciento de ganancia sobre el peso inicial, menos el marcador de lesiones menos el marcador de oocistos (éstos marcadores varían en una escala de 0 a 4 dependiendo de la severidad de la lesión y del número de oocistos hallados por sección después de examinar el duodeno y el intestino delgado de las aves).

Asimismo, se hizo una comparación con un grupo de pollos a los que no se les infectó ni se les trató con el fármaco, y con otro grupo control de pollos a los que se les inoculó, mas, no se les trató con el fármaco.

En las siguientes tablas se pueden observar los resultados de todos los anticoccidíanos experimentados.

Tabla 1. Eficacia de anticoccidianos en pollos después de 7 días de la inoculación.

tratamiento	índice an- ticoccidial	% sobrevi- vientes	% peso	% en lesión	marcadores oocistos
no-med no-inf	135.4	100	35.4	-	-
no-med-inf.	69.8	90	-4.9	6.6	8.7
BA 0.0055%	122.1	100	34.2	3.4	8.7
BA 0.00825%	128.8	100	34.0	0.3	4.9
BA 0.011%	125.4	100	33.9	2.4	6.1
AE 0.0125%	133.1	100	33.6	0.2	0.3
AE 0.025%	136.2	100	36.3	-	0.1
AES	139.7	100	40.0	-	0.3
3,5 DOT 0.0125%	89.2	95	8.2	5.1	8.9

Tabla 2. Eficacia de anticoccidianos en pollos después de 14 días de la inoculación.

tratamiento	índice anticoccidial	% sobrevivientes	% peso	% lesión	% en marcadores oocistos
no-med no-inf	177.4	100	77.4	-	-
no-med inf.	114.5	80	39.2	0.5	4.2
BA 0.0055%	169.7	100	72.5	-	2.8
BA 0.00825%	174.7	100	75.8	-	1.1
BA 0.011%	172.3	100	73.4	-	1.1
AE 0.0125%	180.9	100	81.0	-	0.1
AE 0.025%	179.8	100	79.8	-	-
AES	183.4	100	83.4	-	-
3,5 DOT 0.0125%	155.3	95	60.9	-	0.6

En la tabla 2 se advierte que a los 14 días después de la inoculación, la 3,5 dinitro o-toluamida evita muertes causadas por la coccidiosis en un 95%, el porcentaje de ganancia sobre el peso inicial es de 60.9%, suprime las lesiones debidas a la infección y la producción de oocistos se ve limitada a 0.6.

Este resultado es bueno, no obstante, que el promedio de mortalidad en el control inoculado no-medicado es bajo sin causa aparente ya que en experiencias previas con esporozoitos de la misma fuente causaron una fuerte mortandad en aves.

Desafortunadamente, en la práctica se conoce que después de un cierto tiempo del uso de fármacos anticoccidianos la eficiencia de éstos decrece, debido al fenómeno de adaptación o resistencia que presentan las especies de Eimeria, por tanto, es necesario realizar estudios constantes para investigar nuevos fármacos, así como, verificar la eficacia de los que se emplean actualmente (8).

Mc. Loughlin, D. K. y Gardiner J. L. (17) (18) (19) - (20) (23) (24) demostraron experimentalmente la resistencia de E. tenella a glicarbilamida después de 9 pasajes, a nitrofurazona después de 12 pasajes, a 3,5 dinitro o-toluamida después de 17 pasajes y a amprolium después de 15 pasajes.

Warren, E. W., S. J. y MacKenzie D. R. (21) investigaron la incidencia a la resistencia de las Eimerias al amprolium, nitrofurazona, sulfaquinoxalina, 3,5 dinitro o-toluamida y algunas mezclas anticoccidianas.

En un estudio realizado por Siegman Ø. (22), no se observó resistencia a glicarbilamida y 3,5 dinitro o-toluamida después de 23 pasajes, al amprolium después de 12 pasajes y a nitrofurazona después de 10 pasajes.

Klimes (25), investigó la resistencia de un cultivo de Eimeria tenella a algunos anticoccidianos (3,5 dinitro o-toluamida, 6 azauracilo, nitrofurazona y amprolium), usando pollos de 2 semanas de edad, un cultivo de E. tenella tratado con el fármaco y un control de cultivo de E. tenella sin tratamiento.

El cultivo de E. tenella tratado con 3,5 dinitro o-toluamida se inoculó en pollos que siguieron un tratamiento con el mismo fármaco y también a otro grupo de pollos que una vez inoculados no recibieron más fármaco. El control se inoculó a pollos que no recibieron tratamiento posterior de 3,5 dinitro o-toluamida.

Se observó que después de 20 pasajes que E. tenella estuvo en estudio frente a 3,5 dinitro o-toluamida al 0.0125%, presentó el primer signo de resistencia leve después de 5 pasajes y una resistencia fuerte al fármaco se reconoció después del pasaje 13 y posteriores.

Se advierte que la resistencia a la 3,5 dinitro o-toluamida se desarrolló sumamente rápido, objetando así los resultados de otros experimentos publicados. En este estudio (25) se emplearon las dosis terapéuticas usuales de los anticoccidianos, en cambio, en las investigaciones que efectuaron Mc. Loughlin y Gardiner (18), usaron concentracio-

nes menores de 0.0003% y 0.006% hasta el pasaje 11.

Se han realizado otros estudios para conocer que sucede con la 3,5 dinitro o-toluamida al ser adicionada a los alimentos para aves.

Bevirt (10), demostró que, si, se les suministra a los pollos alimento adicionado de 3,5 dinitro o-toluamida y se sacrifican sin un periodo de retiro del fármaco, se encuentran residuos de éste y de su principal metabolito 3 amino 5 nitro o-toluamida (ANOT) en el tejido muscular (pechuga y piernas) y en el hígado.

Smith, Thiels y Ludwig (26), encontraron que en pollitos alimentados continuamente con 3,5 dinitro o-toluamida marcado con C^{14} , sus tejidos contenían una cantidad significativa de compuestos radioactivos en el hígado, una porción se removía fácilmente de él con una simple extracción, mientras que, la mayoría de la radioactividad aparecía unida químicamente al tejido.

En consecuencia, fue necesario establecer la estructura de los compuestos radioactivos presentes en los tejidos para determinar si la 3,5 dinitro o-toluamida o alguno de sus metabolitos se acumulaban en los tejidos y si esa cantidad implicaba un problema, como una salud expuesta si éstos se ingerían por seres humanos (9).

El trabajo realizado por Smith, Thiels y Ludwig (26) se dividió en tres fases:

- a. identificar el material radioactivo fácilmente extraíble (libre).

b. estudio de métodos para la liberación del material radioactivo unido a los tejidos.

c. identificación de ese material radioactivo.

Pollos leghorn se alimentaron de continuo con 3,5 dinitro o-toluamida C^{14} (-COOH marcado) al 0.0125% y con una actividad específica de 3.15 microcuries/milimol.

Los pollos se sacrificaron después de 8 semanas y los hígados una vez molidos se extrajeron con acetona, ésta se evaporó y el residuo se recuperó con cloroformo, ésta porción se sujetó a una serie de pruebas para caracterizar el compuesto radioactivo fácilmente extraíble determinando que este compuesto era 3,5 dinitro o-toluamida.

Para determinar con precisión los compuestos radioactivos unidos químicamente al hígado fue necesario primero desarrollar un método para liberarlos y extraerlos, después de estudios preliminares se llegó a una hidrólisis enzimática ácida con incubación a 40°C durante 48 horas, con esto se logró aislar la mayoría del material radioactivo y al efectuar las pruebas químicas de identificación se determinó que se trataba de 3 amino 5 nitro o-toluamida.

A fin de conocer, la posible vía que sigue el 3,5 dinitro o-toluamida Smith G. (27), realizó el siguiente estudio pollos leghorn recibieron alimento con 3,5 dinitro o-toluamida marcado con C^{14} y éste se metabolizó formando tres productos principales y tres productos secundarios.

La determinación se verificó recolectando las muestras fecales de los pollos, éstas se extrajeron, los extractos se

concentraron y la separación de los compuestos radioactivos se efectuó usando la técnica de cromatografía bidimensional en papel y los cromatogramas se leyeron en un detector D-47 con ventana de micromel para localizarlos; lo anterior se hizo varias veces para remover las áreas que contenían a los diferentes compuestos radioactivos hasta reunir de 10 a 20 mg de cada compuesto y se procedió a purificarlos para ser analizados.

La identidad de los compuestos se estableció tentativamente con los datos obtenidos de la cromatografía en papel, para conocer la estructura se recurrió al análisis de infrarojo, asimismo, las muestras se examinaron por espectroscopía de masas para determinar pesos moleculares, el contenido de carbono e hidrógeno se analizó por el método de Pregl (28) y el nitrógeno se conoció empleando el método de Dumas (29).

En base a la identificación de los compuestos radioactivos aislados de la materia fecal de las aves es posible postular diversos caminos por los cuales el fármaco se metaboliza.

El primer paso en el metabolismo es la reducción de uno de los grupos nitro con formación de 3 amino 5 nitro o-toluamida, el segundo paso es la hidrólisis del grupo amida con la formación del correspondiente ácido toluico.

La hidrólisis del 3 amino 5 nitro o-toluamida parece más rápida que la del 5 amino 3 nitro o-toluamida; ésto se detectó al hallar cantidades iguales de 3 amino 5 nitro o-toluamida 22% y ácido 3 amino 5 nitro o-toluico 20% en cambio, de 5 amino 3 nitro o-toluico el 6%, esto se debe a los enlaces internos que son más fuertes en el caso del 5 amino.

También existe la posibilidad de que la 3,5 dinitro o-toluamida se transforme en ácido 3,5 dinitro o-toluico seguido por la reducción del grupo nitro, de ésto sólo se encontró trazas.

Por tanto, se puede afirmar que la reducción de los grupos nitro es el principal paso en el metabolismo de la 3,5 dinitro o-toluamida seguido de la hidrólisis que ya son reacciones más limitadas, puesto que solo se encontró el 29% del grupo amida convertido en grupo carboxilo.

Además de ser importante ratificar en los fármacos anticoccidianos, la dosis eficaz, el modo de acción, el metabolismo, la seguridad de su uso, etc.; es imprescindible lograr su identificación y análisis cuantitativo, ésto constituye un serio problema, lo mismo, para el analista de un Laboratorio de Control de Calidad, que para los servicios de represión de fraudes, debido al número y complejidad - - -

de los aditivos presentes en los alimentos modernos para aves y a las dosis de fármacos que cada vez son más imperceptibles.

En consecuencia, se han efectuado numerosos estudios para resolver éste problema; Knapstein (30), verificó la identificación de: nitrofurazona, 3,5 dinitro o-toluamida, furazolidona, amprolium y furnicozona usando una técnica de cromatografía en placa fina e investigó la separación cuantitativa de pares de éstos compuestos cuando están mezclados.

Hammond P. W. y Weston R. E. (31), extendieron el trabajo de Knapstein describiendo un procedimiento para detectar la presencia común de 17 fármacos en alimentos para aves, usando dos sistemas de disolventes con propósitos de separación, la forma en que se realiza es la siguiente: el alimento una vez extraído con una mezcla de acetonitrilo y cloroformo 1:1, se decanta a una columna de alúmina, se recoge el primer eluato que contiene la 3,5 dinitro o-toluamida, se evapora, se aplica en la placa para cromatografía de sílica gel G, se desarrolla en una mezcla de cloroformo metanol 9:1 y se examina bajo luz U.V.: la 3,5 dinitro o-toluamida muestra una mancha oscura con un Rf igual a 0.37, rociando la placa con diamino etanol adquiere un color violeta y con soluciones para diazoación (cloruro estanoso y nitrato de sodio en ácido clorhídrico diluido y sol. de N-naftilendiamina diclorhidrato) un color rojo violeta.

G. F. Bories (32), especificó otra forma eficaz para la identificación simple de 13 aditivos en alimentos compuestos

usando la cromatografía en placa fina. La lista de éstos 13 aditivos es: furazolidona, nitrofurazona, nitrovin, zoaleno (3,5 dinitro o-toluamida), dimetridazol, ronidazol, clopidol, buquinolato, decoquinato, metilbenzocuoato, carbadox, etopabato y amprolium.

La determinación consiste en la extracción sucesiva de una misma cantidad de muestra de alimento con 4 disolventes: hexano, acetona, cloroformo y metanol, guardando cada extracto excepto el primero que corresponde al hexano ya que éste sólo permite la eliminación de ciertas sustancias interferentes, la 3,5 dinitro o-toluamida se localiza en el extracto acetónico, éste se evapora, se aplica en placas cromatográficas de sílice GF₂₅₄ fluorescente que se dividen en carriles, al primer carril se le aplica el extracto acetónico adicionado de aditivos de referencia, en el segundo carril se aplica una mezcla de aditivos de referencia y al tercer carril se le aplica el extracto acetónico únicamente.

La placa se desarrolla en una mezcla de acetato de étilo-cloruro de metileno 1:1, a los 10 cm se retira, se seca y se introduce a un segundo sistema de desarrollo cloroformo-metanol 9:1. La placa se revela con etilendiamino, tomando la 3,5 dinitro o-toluamida un color violeta.

Se han desarrollado diferentes procedimientos para la determinación cuantitativa de la 3,5 dinitro o-toluamida. Esta es la parte más importante para el químico de un Laboratorio de Control de Calidad, ya que contará con una variedad de técnicas analíticas, adoptando la más conveniente para sí.

Basándose en la reacción de óxido-reducción entre el estaño y los grupos nitro aromáticos en soluciones acuosas de ácido clorhídrico, Vanderzee y Edgell (33) desarrollaron un método sencillo para la determinación gravimétrica de compuestos nitro aromáticos, que no requiere de un equipo especial y el tiempo operacional es breve, en consecuencia, se pueden realizar varias determinaciones a la vez.

La reacción (33) se efectúa en un matraz erlenmeyer de boca esmerilada con un condensador de reflujo provisto de un tubo de vidrio que sirve como alimentador de dióxido de carbono. El estaño se limpia agitándolo en una mezcla de 50 ml de metanol, 50 ml de ácido clorhídrico 0.75 M y 2 ml de ácido nítrico concentrado, el estaño se filtra, se lava con agua, después con metanol y se seca, la superficie permanece brillante y limpia durante un periodo de tiempo considerable.

Un shott de porosidad media con aproximadamente 10 g de estaño limpio y granulado en malla 30 se pone a peso constante a 75°C, se pesa y el estaño se transfiere cuantitativamente al matraz de reacción con una cantidad pesada exactamente del compuesto nitro aromático, se añaden de 5 a 25 ml de metanol RA; el matraz se conecta al condensador se coloca en una parrilla y entonces se le adiciona a través del condensador 35 ml de ácido clorhídrico 0.75 M y la cantidad necesaria de agua para tener 75 ml, la mezcla de reacción se calienta cuidadosamente durante 1 hora, entonces el estaño se filtra en forma cuantitativa en el shott lavando el

matraz con agua y metanol, se seca el shott nuevamente a 75°C hasta peso constante y se determina su peso.

De la cantidad de estaño que ha reaccionado se calcula la cantidad de grupo nitro, el shott con el estaño se pueden usar en determinaciones sucesivas. Para optimizar la reacción es necesario conocer el efecto de varios factores: La introducción de una corriente moderado de dióxido de carbono a través del tubo alimentador elimina el error causado por el oxígeno atmosférico. Los resultados en la variación de concentración del ácido clorhídrico indican que el estaño depende de él y el error es mínimo si se emplean bajas concentraciones de ácido clorhídrico (0.5 a 1 M).

También es recomendable usar la mínima cantidad de metanol, sólo la necesaria para solubilizar el compuesto nitro aromático.

Es conveniente desde el punto de vista de datos experimentales, usar una muestra del compuesto nitro aromático que consuma de 0.6 a 0.8 g de estaño, además, de permitir un reflujo que dure de 30 a 60 min.

Este, es un método útil en el análisis de 3,5 dinitro o-toluamida como materia prima, como procedimiento analítico em premezclas primero se debe extraer con metanol, llevar a volumen y tomar una alícuota con la concentración suficiente para que reaccione la cantidad de estaño recomendada, debido a la concentración en la que la 3,5 dinitro o-toluamida se usa en alimentos y a la composición de éstos,

este método no se puede aprovechar.

Basados en la reacción colorimétrica entre el cianuro de potasio y 3,5 dinitro o-toluamida, Grant y Smith (12) desarrollaron un método de valoración que podría emplearse para análisis de materia prima únicamente ya que el complejo colorido amarillo que se forma es estable e inalterable en condiciones ambientales y exhibe un pico de absorción a 360 nm, empero, esta longitud de onda a la que absorbe el compuesto es la misma región en la que los pigmentos de las plantas presentes en las premezclas y alimentos con 3,5 dinitro o-toluamida se leen (300 a 400 nm).

Grant, Smith, Marlene y Swank (12) (34) (35), desarrollaron una técnica colorimétrica que se basa en la extracción de 3,5 dinitro o-toluamida con dimetilformamida y la formación de un complejo colorido violeta con metilamina.

Este procedimiento tiene 3 ventajas definidas:

1. La reacción es específica para 3,5 dinitro o-toluamida.
2. Ninguno de los posibles productos de degradación del fármaco dan reacción positiva.
3. El complejo colorido exhibe un pico de absorción a 550 nm y su color intenso permite detectar mcg. del fármaco, además en esa porción del espectro visible la mayoría de los pigmentos presentes en las premezclas y alimentos no muestran bandas de absorción.

La mayor desventaja del método, es la inestabilidad del complejo colorido, en consecuencia, se investigaron diversos factores que influyen en la intensidad y estabilidad del com

plejo colorido variando cada uno de ellos independientemente:

a. Influencia de aminas en la formación del color.

Alícuotas de una solución de 3,5 dinitro o-toluamida en dimetilformamida se mezclaron con volúmenes iguales de soluciones de aminas a 20°C y las absorbancias se determinaron de 650 a 350 nm inmediatamente.

De todas las aminas que se probaron sólo aquellas conteniendo grupos amino primario generaron complejos coloridos violetas, las aminas secundarias formaron complejos coloridos verdes o amarillos. Las poliaminas de alto peso molecular son sólidas o tienen una gran viscosidad, por tanto, son deficientes para efectuar ésta reacción. Las diaminas desarrollaron un intenso color exhibiendo generalmente 2 picos de absorción uno de 350 nm a 450 nm (variable) y el otro de 500 a 600 nm (similar).

b. Influencia de la concentración de la amina en la formación del color.

Se estudió variando la concentración de la amina y del disolvente (dimetilformamida) permaneciendo constante la cantidad de 3,5 dinitro o-toluamida.

La máxima intensidad de color se logró cuando la amina alcanzó de un 55 a 65% de concentración del volumen total.

c. Influencia de los disolventes en la formación del color.

Se realizaron varios intentos para reemplazar el disolvente, dimetilformamida, por otros que facilitarían la solubilidad de la metilamina.

En general, todos los disolventes que se probaron fueron de-

ficientes, excepto, dimetilformamida, acetonitrilo y piridina y de ellos la dimetilformamida dió mayor intensidad de color.

d. Influencia de los contaminantes en la formación del color. Durante esta investigación se halló que trazas de ácido fórmico presentes en el disolvente (dimetilformamida), alteraban el complejo colorido seriamente, asimismo, la reacción colorimétrica se inhibió en presencia de ácido sulfúrico, ácido clorhídrico y con grandes cantidades de alcohol y acetona.

e. Influencia de la temperatura en la formación del color. Se efectuó con una serie de soluciones de 3,5 dinitro o-toluamida en dimetilformamida ajustadas a diferentes temperaturas, a cada una de ellas se les añadió un volumen igual de metilamina a 5°C y la mayor absorbancia se midió a 550 nm observando que a mayor temperatura corresponde un decremento en la intensidad del color, por consiguiente, se recomendó mantener la solución de metilamina entre 3 y 5°C y la de dimetilformamida a 20°C (35).

f. Especificidad de la reacción entre dimetilformamida y metilamina.

Se realizó un estudio extenso (35), para determinar si podían ser diferenciadas la 3,5 dinitro o-toluamida y la 3,5 dinitro benzamida espectrofotométricamente, el estudio se verificó en una variedad de compuestos relacionados con su estructura química:

1. isómeros de dinitro benzamida.
2. isómeros de dinitro o-toluamida.

3. 3,5 dinitro benzamida, 2'alquil sustituidos.
4. 3,5 dinitro o-toluamida, 2 sustituidos.
5. dinitro o-toluamida, N-sustituidos.

La investigación se efectuó preparando soluciones de cada una de ellas con una concentración final de 10mcg/ml y leyéndolas inmediatamente que se formaba el complejo. Con los resultados que se obtuvieron Grant y Smith (35), afirmaron que la reacción entre la 3,5 dinitro o-toluamida en dimetilformamida con metilamina se puede usar para conocer su pureza y adaptarla en investigaciones bioquímicas de sus metabolitos.

g. Estabilidad de los compuestos coloridos.

Cuando se produjeron complejos coloridos con 3,5 dinitro o-toluamida y monoaminas alifáticas las absorbancias de las reacciones fueron difíciles de determinar debido a la inestabilidad del color, ésta se atribuye al bajo punto de ebullición de las aminas y a su escasa solubilidad en el disolvente (dimetilformamida), siendo necesario usar soluciones acuosas las cuales aniquilan el color.

Los resultados indican que todos los complejos formados con diaminas son estables, preferentemente, cuando tienen los 2 grupos amino terminales; en la reacción de 3,5 dinitro o-toluamida en dimetilformamida con el 1,3 diamino propano se encontró el mayor equilibrio e intensidad de color, el uso de la diamina está limitado a causa de su costo y manejo; el complejo formado presenta un máximo de absorbancia a 560 nm.

Cuando en 1960 se justificó el uso de 3,5 dinitro o-toluamida como fármaco anticoccidiano en alimentos avícolas se establecieron límites de tolerancia para el y sus metabo-

litos, por tanto, se desarrollaron métodos para su determinación; Thiégs (36) elaboró un método para conocer las cantidades de 3,5 dinitro o-toluamida y su metabolito principal 3 amino 5 nitro o-toluamida en pollos que recibieron el fármaco durante un tiempo, y que se sacrificaron sin un periodo de retiro del fármaco.

El análisis se fundamenta en la extracción del tejido con acetona, se le adiciona benceno para separar la solución en dos fases. La capa orgánica se concentra y se pasa a través de una columna de alúmina activada, la 3,5 dinitro o-toluamida se adsorbe y se lava con cloroformo, se eluye con alcohol al 80% y esta solución se evapora casi a sequedad, el residuo se disuelve con dimetilformamida y se forma un complejo colorido adicionando 1,3 diamino propano que se lee a 560 nm, se prepara en forma paralela una curva estándar.

En general, los resultados que se obtuvieron con éste procedimiento se consideran satisfactorios y reproducibles, por lo que se recomendó su adopción como método oficial.

El complejo formado entre la 3,5 dinitro o-toluamida en dimetilformamida y el 1,3 diamino propano, también puede servir para distinguir el fármaco cuando se encuentra combinado con otro anticoccidiano común la 3,5 dinitro benzamida.

La diferencia de éstos en estudios biológicos se establece en base a la comparación de sus curvas espectrales (34) (37); una vez formados los complejos de los 2 fármacos se leen en el espectrofotómetro de 600 a 540 nm y se calculan los radios de absorbancia siguientes: 600/540 y 600/560 nm.

Los radios de absorbancia para la 3,5 dinitro o-toluamida son del orden de 0.5 a 0.6 y la 3,5 dinitro benzamida presenta radios del orden de 0.1 a 0.2.

Además el procedimiento anterior tiene la aplicación en la identificación del metabolito principal de la 3,5 dinitro o-toluamida, el 3 amino 5 nitro o-toluamida, primero transformando el compuesto dinitro al metabolito con ácido peracético. para después efectuar la formación del complejo y de terminar los radios de absorbancia.

Getzendaner (38) (39), Ioset (40) y Smith (41) investigaron otra reacción colorimétrica para la determinación de 3,5 dinitro o-toluamida en alimentos recientemente preparados, que se basa en la extracción del fármaco en dimetilformamida y la formación de un complejo verde usando metóxido de sodio 0.1 N en alcohol metílico.

El complejo es específico (41) y exhibe un máximo de absorción a 640 nm, es necesario preparar una curva estándar en las mismas condiciones y efectuar las lecturas inmediatamente después de formar el complejo para evitar que la solución oscurezca y dé resultados falsos.

Este procedimiento descrito es útil en alimentos frescos con una concentración del fármaco que varíe de 0.004% a 0.0375%. Se obtuvo con el método un $98 \pm 1.5\%$ de recuperación y la reproducibilidad fue de $0.0124 \pm 0.007\%$.

Stevens S. G. (11) basado en un método desarrollado por Getzendaner (42) determinó la concentración de 3,5 dinitro o-toluamida en alimento preformado.

La recuperación del fármaco se basa en la extracción de éste con acetonitrilo al 85%, durante 30 min. y a una temperatura de $50 \pm 5^\circ\text{C}$; en alimentos que contengan menos de 1% de fármaco es necesaria la adición de alúmina activada con el fin de remover las sustancias que interfieran, la solución se filtra, se lleva a volumen, se hacen las diluciones pertinentes y se desarrolla color con etilendiamina, el complejo exhibe un máximo a 560 nm. se debe preparar una curva estándar paralelamente.

Para verificar si el alimento medicado con 3,5 dinitro o-toluamida resistía las condiciones del análisis se investigó (11) el efecto del calor y la humedad en una muestra que contenía 154 ppm del fármaco, ésta se introdujo a un frasco provisto de tapón y se calentó con vapor durante 10 min, una segunda muestra se calentó en autoclave a una presión de 10 psi. durante 5 min.

Con los resultados obtenidos, se consideró que la 3,5 dinitro o-toluamida no se alteraba en las condiciones de trabajo del método propuesto (11).

El procedimiento de 3,5 dinitro o-toluamida en alimentos que varíen en una concentración de 0.004% a 0.0125%, y en premezclas o alimentos concentrados con un 25% de fármaco, además, el método de Getzendaner tiene una adaptación automatizada (43) que determina 80 muestras en 1 hora.

En general, los métodos espectrofotométricos para analizar la 3,5 dinitro o-toluamida ya como materia prima, en alimentos o premezclas, tienen la desventaja de requerir del uso de algunos agentes altamente tóxicos, tales como, aceto-

nitrilo, dimetilformamida, metilamina, etc. En la búsqueda de reactivos menos tóxicos Severijnen y Buizer (44) encontraron una reacción de Janovsky que se podía aplicar en la determinación de 3,5 dinitro o-toluamida y buscaron los límites de concentración adecuados para que la ley de Beer se cumpliera.

El método espectrofotométrico se fundamenta en la extracción del fármaco en un embudo de separación con una mezcla de acetona, agua (1:1) y diclorometano (útil debido a su solubilidad y baja toxicidad) en medio ácido, se decanta la fase orgánica, los extractos se reúnen se evaporan a 35°C hasta tener un volumen pequeño. Esta solución se pasa por una columna de alúmina activada, la 3,5 dinitro o-toluamida se eluye con metanol, se recoge el eluato y se evapora a 50°C, el residuo se disuelve con acetona y se lleva a volumen, se toma una alícuota conveniente y se forma el complejo colorido adicionando 0.4 ml de hidróxido de sodio al 15%, se agita y se lee antes de 3 min. a 576 nm usando agua como blanco, además se prepara una curva estándar y los siguientes blancos: alícuota del problema y 0.4 ml de agua, alícuota de acetona y 0.4 de hidróxido de sodio al 15% éstos valores se restan de la muestra.

Con ésta reacción se elimina el uso de agentes tóxicos su desarrollo es muy sencillo y forma un complejo colorido de gran intensidad, pero como en otras reacciones ya citadas presenta como desventaja el desvanecimiento de color, por tanto, su lectura es imperativa dentro de los 3 primeros minutos.

Severijnen y Buizer (44) averiguaron que el uso de o-

tros aditivos quimioterapéuticos comunes a los alimentos avícolas en dosis normales no interfieren con el desarrollo del método, excepto, 3,5 dinitro benzamida y ésta se puede distinguir de 3,5 dinitro o-toluamida usando una solución de hidróxido de amonio concentrado en lugar de la solución de hidróxido de sodio al 15% debido a que la 3,5 dinitro benzamida reacciona con el hidróxido de amonio formando un complejo de color azul, en cambio, 3,5 dinitro o-toluamida no reacciona. Con este procedimiento se pueden determinar contenidos de 3,5 dinitro o-toluamida de 10 mg/kg; el método se ha usado durante 2 años en forma rutinaria con resultados satisfactorios.

Fauth y Roecker (45), investigaron otra reacción para determinar la posibilidad de usarla en análisis cuantitativo, que se basa en la reducción del grupo nitro por el tricloruro de titanio. La reacción entre el tricloruro de titanio y los compuestos nitro aromáticos se conoce bien; para nitroparafinas Rodd ha propuesto la siguiente reacción:



El análisis se efectúa pesando una muestra del compuesto dinitro, el cual se disuelve y afora con ácido acético glacial, se toma una alícuota y se transfiere a un matraz provisto de 2 entradas, por una de las entradas se le pasa una corriente de dióxido de carbono, y por la otra entrada se introducen 10 ml de una solución de tricloruro de titanio 0.2 N. La mezcla se lleva a reflujo durante 10 min, se enfría a temperatura ambiente y se le añaden 2 ml de solución de

tiocianato de potasio al 20%, se titula con sulfato férrico amoniacal 0.1 N hasta una coloración rojo-naranja que persista durante 30 seg., se debe correr un blanco en las mismas condiciones.

Teóricamente para los compuestos gem-dinitro, se reduce un grupo nitro que corresponde a 6 equivalentes de Ti III.

En cambio, en los compuestos con 3 grupos nitro sobre un carbono terminal se reducen 2 grupos nitro consumiendo 12 equivalentes de Ti III.

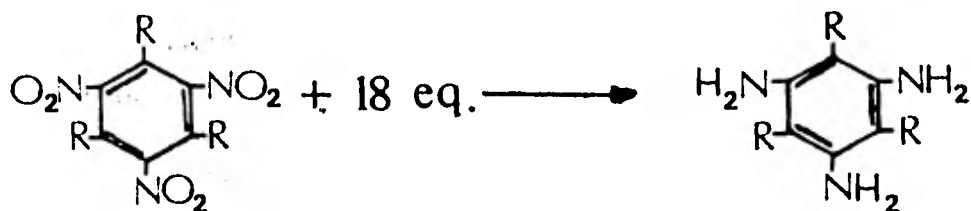
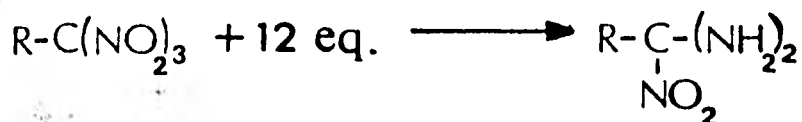
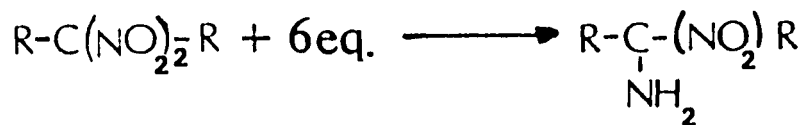
Y para compuestos aromáticos con 3 grupos nitro se reducen los 3, por tanto, se requieren 18 equivalentes de Ti III.

Los resultados que se encontraron en los compuestos gem-dinitro estudiados en este artículo (45) concuerdan con la teoría satisfactoriamente, puesto que, en el ácido 4,4 dinitro pentanoico se obtuvieron 5.97 equivalentes de agente reductor por molécula y con 2,2 dinitro propano se hallaron 5.46 equivalentes por molécula.

En los compuestos trinitro se consumieron 12 equivalentes de Ti III por molécula que indica la reducción de 2 grupos nitro; en los grupos aromáticos se obtuvo una reducción de 3 grupos nitro conforme a la teoría.

Aunque se desconocen los productos finales de la reacción se pueden obtener resultados reproducibles en las determinaciones de compuestos nitro, si se utilizan estos valores para el número de equivalentes de Ti III consumidos, por mol de nitro compuesto, basándose en las siguientes su-

posiciones:



La razón de que no todos los grupos nitro se reduzcan está bajo investigación, lo único que se sabe es que la reacción es sensible a la cantidad de ácido presente debido a que la inhibe y causa hidrólisis de la solución de titanio III.

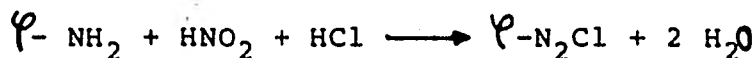
Como se ha dicho anteriormente la medicina veterinaria recurre al uso de fármacos heterogéneos (9) ya sea para evitar los riesgos debidos a una ingestión elevada de oocistos (coccidiosis) ó para inmunizar a las aves (1).

Se ha comprobado la eficacia de diversos fármacos anticoccidianos, ya citados, y la eficiencia al mezclarlos, lo mismo con antibióticos (10) (11) ó con otros agentes quimio terapéuticos (44); entre éstos están las sulfonamidas (1) que se saben son útiles en el tratamiento de la enfermedad

causada por la diversas especies de Eimeria. Para producir la inmunización frente a E. acervulina se recomienda su uso al 0.005% (1), también se ha reportado su actividad contra E. hagai y E. maxima.

La mayoría de las sulfonamidas de interés farmacéutico tienen el grupo amino en la posición para y algunos de sus métodos analíticos se basan en la determinación de éste grupo.

El grupo amino aromático se puede analizar por el método de diazoación que es el método oficial para casi todas las sulfonamidas en la U.S.P., N.F., F.N.E.U.M. éste método consiste en titular con una solución de nitrito de sodio, la reacción se efectúa cuando el grupo amino aromático y el ácido nitroso forman la sal de diazonio:



Algunos investigadores como Agren (46), La Rocha (46) y Pifer (46), demostraron que no es necesario efectuar la titulación a bajas temperaturas y que la temperatura ambiente es satisfactoria, si, la punta de la bureta que contiene la solución estandarizada de nitrito de sodio se acerca a la superficie de la solución a titular, para que, el ácido nitroso tenga mayor oportunidad de reaccionar sin pérdida en la atmósfera. La determinación de la amina en el método colorimétrico se basa en efectuar primero la diazoación y posteriormente la copulación formando un complejo colorido al cual se le determina su absorbancia en la región visible generalmente de 540 a 550 nm, se debe preparar ya sea una cur-

va estándar o una solución de referencia a la misma concentración de los problemas.

Se recomienda que cuando se realicen determinaciones de sulfonamidas en alimentos o muestras clínicas, primero se deproteinicen las soluciones con ácido tricloroacético, ácido p-toluensulfónico, ácido tiosalicílico, o alcohol.

Debido a la frecuencia de combinaciones farmacéuticas con 2 o más sulfonamidas, Novelli (46) investigó un método de separación empleando una técnica de cromatografía en papel descendente. Las muestras se aplican en carriles comparando con estándares y se revelan con soluciones de diazoación, apareciendo manchas color rosa-violeta. Novelli (46) reporta a la sulfaguanidina con un Rf igual a 0.48, además, indica que la técnica se puede emplear para análisis cuantitativo.

Werner (46), desarrolló otro método colorimétrico empleando como reactivo p-dimetilaminobenzaldehído que produce un complejo de color amarillo, en estudios posteriores se observó que la reacción se modifica según el pH, por tanto, este debe ser controlado, asimismo la absorción es relativamente baja, por consiguiente, las impurezas coloridas interfieren con el método, mas, La Rosa (46) elaboró con este reactivo una prueba de identificación rápida de sulfonamidas en papel whatman previamente preparado donde se obtienen colores característicos según la sulfonamida adicionada.

Algunas de las sulfonamidas se pueden titular en sistemas no-acuosos en base a las propiedades ácidas de su grupo

va estándar o una solución de referencia a la misma concentración de los problemas.

Se recomienda que cuando se realicen determinaciones de sulfonamidas en alimentos o muestras clínicas, primero se deproteinicen las soluciones con ácido tricloroacético, ácido p-toluensulfónico, ácido tiosalicílico, o alcohol.

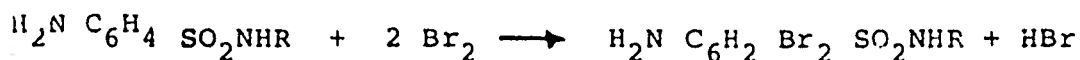
Debido a la frecuencia de combinaciones farmacéuticas con 2 o más sulfonamidas, Novelli (46) investigó un método de separación empleando una técnica de cromatografía en papel descendente. Las muestras se aplican en carriles comparando con estándares y se revelan con soluciones de diazoación, apareciendo manchas color rosa-violeta. Novelli (46) reporta a la sulfaguanidina con un R_f igual a 0.48, además, indica que la técnica se puede emplear para análisis cuantitativo.

Werner (46), desarrolló otro método colorimétrico empleando como reactivo p-dimetilaminobenzaldehído que produce un complejo de color amarillo, en estudios posteriores se observó que la reacción se modifica según el pH, por tanto, este debe ser controlado, asimismo la absorción es relativamente baja, por consiguiente, las impurezas coloridas interfieren con el método, mas, La Rosa (46) elaboró con este reactivo una prueba de identificación rápida de sulfonamidas en papel whatman previamente preparado donde se obtienen colores característicos según la sulfonamida adicionada.

Algunas de las sulfonamidas se pueden titular en sistemas no-acuosos en base a las propiedades ácidas de su grupo

-SO₂NH- empleando como disolventes: dimetilformamida, butilamina, etilendiamina, como titulante se usa metóxido de sodio en benceno metanol en presencia de azul de timol que actúa como indicador.

Las sulfonamidas reaccionan con el Br₂ que se sustituye en el anillo bencénico. Dependiendo de la sulfonamida se puede efectuar cualquiera de las dos reacciones que se pueden expresar así:



Existen 2 procedimientos generales de bromación en el análisis de las sulfonamidas (46):

1. La sulfonamida se puede titular directamente con bromato en presencia de bromuro y el punto final de la titulación se observa potenciométricamente o con rojo de metilo de indicador.

2. Se adiciona a la solución de sulfonamida un pequeño exceso de bromato, se deja reposar y se titula el exceso.

La titulación argentométrica (46), es otro método que se emplea en la determinación de sulfonamidas, se fundamenta en que éstas forman sales de plata insolubles, sin embargo, no se puede aplicar a la sulfaguanidina.

III PARTE EXPERIMENTAL

Para evitar la coccidiosis aviar existe una variedad de fármacos, el uso de éstos anticoccidianos en alimentos para aves es un factor importante en el desarrollo de la industria avícola (9), por ello, es esencial un método analítico, rápido, de fácil manipulación, con un alto grado de seguridad, reproducibilidad y especificidad para su DETERMINACION (12).

La presentación del producto estudiado, es una mezcla de 3,5 dinitro o-toluamida y sulfaguanidina ambos fármacos dan al ave una eficiente protección, lo mismo a pollos de engorda, a pollas de reposición o reproductoras en piso, y se adquiere en sacos conteniendo 20 Kg de premezcla siendo la cantidad de cada uno de los principios activos por cada kilogramo el siguiente:

3,5 dinitro o-toluamida (D.O.T.)	250 g
p-aminobencensulfonilguanidina (sulfaguanidina) .	100 g
Excipiente c.b.p.	1000 g

D.O.T. (47). (48).

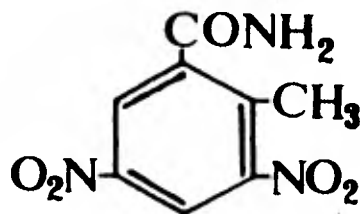
Sinónimos: 3,5 dinitro o-toluamida; dinitolmida;
2-metil-3,5 dinitrobenzamida; 3,5 dinitro
2-metil benzamida; metildinitrobenzamida.

Nombre de patente: zoaleno, ingrediente de zoamix.

Fórmula condensada: $C_8H_7N_3O_5$

Peso molecular: 225.2

Fórmula desarrollada:



Descripción: Es un polvo cristalino amarillo.

Punto de fusión: 181°C

Solubilidad: Es un soluble en cloroformo y acetona.

Extracción: La dinitolmida es extraída por el cloroformo de soluciones alcalinas acuosas.

Espectro de absorción en infrarrojo: En pastilla de bromuro de potasio presenta los siguientes picos principales: A 1342 ó 1527 cm^{-1}
B 1672 cm^{-1}
C 1612 cm^{-1}

Categoría terapéutica en veterinaria: anticoccidiano.

Técnica analítica de la valoración de la 3,5 dinitro
o-toluamida.

Principio:

La determinación se fundamenta en la reducción del grupo nitro por el tricloruro de titanio III adicionado en exceso y la retitulación de éste con solución de sulfato férrico amoniacal 0.1 N en presencia de solución de tiocianato de potasio que actúa como indicador.

Material:

bureta de 25 ml de capacidad
matraz volumétrico de 250 ml
pipeta volumétrica de 20 ml
pipeta volumétrica de 15 ml
pipetas graduadas de 10 ml y 25 ml
matraz de iodo de 250 ml

Reactivos:

acetona R.A.

ácido acético glacial R.A.

solución de acetato de sodio al 40% acuosa.

solución de tricloruro de titanio III al 2.25% ++

mezcla de ácido clorhídrico agua (60:40)

solución acuosa de tiocianato de potasio al 10%

solución estandarizada de sulfato férrico amoniacal
0.1 N

++ La solución de tricloruro de titanio III generalmente se vende al 15%, por tanto, es necesario hacer la dilución apropiada; se recomienda además preparar sólo lo indispensable para su uso diario y guardarla en frasco de vidrio actínico.

Procedimiento para la valoración de la 3,5 dinitro o-toluamida em premezcla de alimento para aves.

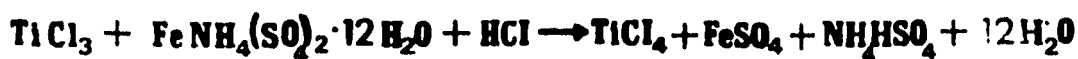
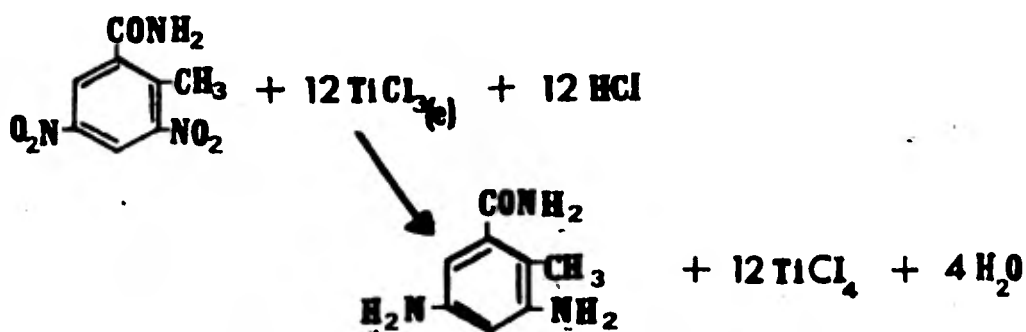
Pesar exactamente una cantidad de premezcla equivalente a 250 mg de principio activo (aproximadamente 1 g) e introducir a un matraz volumétrico de 250 ml, adicionar aproximadamente 150 ml de acetona, la extracción se efectua con agitación mecánica durante 30 minutos llevar a volumen con acetona y homogeneizar, dejar reposar 10 minutos para que sedimente.

Del líquido sobrenadante tomar una alícuota de 20 ml y colocarla en un matraz de iodo de 250 ml de capacidad, añadir 10 ml de ácido acético glacial y 15 ml de una solución acuosa de acetato de sodio al 40%, se toman exactamente 15 ml de la solución de tricloruro de titanio III y adicionarla al matraz, tapar, agitar levemente y se deja reposar durante 10 minutos; agregar 25 ml de la mezcla de ácido clorhídrico: agua (60:40) y 2 ml de solución de tiocinato de potasio al 10% como indicador.

La titulación se efectua con la solución de sulfato férrico amoniacal 0.1N, el vire que se observa va del violeta a incolora, después adquiere un color naranja que persiste e indica el punto final de la titulación.

Realizar en forma paralela un blanco, por cada serie de muestras que se trabajen y para cada solución de tricloruro de titanio III al 2.25% que se emplee.

Reacción que se efectua en la valoración de la 3,5 di
nitro o-toluamida.



Cálculos:

Se determina el contenido en gramos de la 3,5 dinitro o-toluamida por kilogramo de premezcla con la siguiente ecuación:

$$\frac{(V_B - V_p) \times N \times \text{meq} \times \text{af} \times 1000}{g \times \text{alic.}} = \text{g } 3,5 \text{ DOT/Kg}$$

g = gramos del problema

alic = alícuota del problema

V_B = volumen gastado por el blanco

V_p = volumen gastado por el problema

N = Normalidad del sulfato férrico amoniacal

meq = miliequivalente del principio activo.

af = aforo del problema.

Parte práctica:

Se eligieron 15 lotes de premezcla y se marcaron del número 1 al 15, la determinación del principio activo (la 3,5 dinitro o-toluamida) se realizó por duplicado en cada lote.

Para el desarrollo de la técnica analítica en la valoración de 3,5 dinitro o-toluamida antes descrita, los 15 lotes se dividieron en 3 partes, trabajando, por tanto, series de 5 lotes cada vez.

De las otras soluciones empleadas se preparó la cantidad suficiente para el análisis de los 15 lotes.

Normalidad de la solución de sulfato férrico amoniacal 0.09615 N.

El miliequivalente del principio (49), se determinó de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Peso molecular}}{12 \times 1000} = \text{miliequivalente de DOT.}$$

$$\frac{225.16}{12 \times 1000} = 0.01876333$$

Redondeando el valor del miliequivalente de la 3,5 di-nitro o-toluamida es igual a 0.0188.

A continuación se presenta un cuadro con los resultados que se obtuvieron en los 15 lotes analizados y posteriormente el estudio estadístico efectuando en ellos.

Cuadro de resultados de la valoración del fármaco 3,5 dinitro o-toluamida en premezcla de alimento para aves.

		C O L U M N A S					
		1	2	3	4	5	
F I L A S	A	249.61	247.32	251.71	245.14	254.19	g/kg
	B	249.47	246.85	250.77	246.09	254.09	g/Kg

		C O L U M N A S					
		6	7	8	9	10	
F I L A S	A	252.78	248.39	243.81	248.52	250.69	g/Kg
	B	251.71	248.53	243.96	247.22	250.67	g/Kg

		C O L U M N A S					
		11	12	13	14	15	
F I L A S	A	246.10	253.05	248.43	249.18	256.36	g/Kg
	B	244.92	253.71	248.33	248.53	256.26	g/Kg

Las ecuaciones empleadas en el análisis estadístico son:

Medias de las columnas (Tc+) :

$$T_{c+} = u_{1c} + u_{2c} + \dots + u_{nc}/n$$

Tc+ = media de las columnas

$u_{\#c}$ = resultado de la valoración en la columna c.

n = número de observaciones en cada categoría (columnas)

Media de las filas (T+r) :

$$T_{+r} = u_{r1} + u_{r2} + \dots + u_{rn}/n$$

T+r = media de las filas

$u_{r\#}$ = resultado de la valoración en la fila r.

n = número de observaciones en cada categoría (filas)

Suma de los cuadrados para estimar la varianza a partir de las columnas (Sc) :

$$Sc = (u_{1c})^2/n + (u_{2c})^2/n + \dots + (u_{nc})^2/n - T_{++}^2/N$$

Sc = suma de los cuadrados de las columnas

$(u_{\#c})^2$ = resultado de la valoración en la columna c elevado al cuadrado.

n = número de observaciones en cada categoría (columnas)

T_{++}^2 = suma total de las observaciones al cuadrado

N = número total de observaciones

Suma de los cuadrados para estimar la varianza a partir de las filas (Sr) :

$$Sr = (u_{r1})^2/n + (u_{r2})^2/n + \dots + (u_{rn})^2/n - T_{++}^2/N$$

Sr = suma de los cuadrados de las filas

$(u_{r\#})^2$ = cuadrado del resultado de la valoración en la fila r

n = número de observaciones en cada categoría

T_{++}^2 = cuadrado de la suma total de las observaciones

N = número total de observaciones

Suma total de los cuadrados (S_T) :

$$S_T = (u_1)^2 + (u_2)^2 + \dots + (u_n)^2 - T_{++}^2 / N$$

S_T = suma total de los cuadrados

$(u_{\#2})^2$ = cuadrado de cada una de las observaciones (c y r)

T_{++}^2 = cuadrado de la suma total de observaciones

N = número total de observaciones

Determinación del residual (R) :

$$R = S_T - S_r - S_c$$

R = residual

S_T = suma total de los cuadrados

S_r = suma de los cuadrados de las filas

S_c = suma de los cuadrados de las columnas

Grados de libertad (gl) :

$$gl = k - 1$$

gl = grados de libertad

k = categorías

Cuadrado medio de las filas (C_{Mr}) :

$$C_{Mr} = S_r / gl_r$$

C_{Mr} = cuadrado medio de las filas

Sr = suma de los cuadrados de las filas

gl_r = grados de libertad de las filas

Cuadrado medio de las columnas (C_{Mc}) :

$$C_{Mc} = Sc / gl_c$$

C_{Mc} = cuadrado medio de las columnas

Sc = suma de los cuadrados de las columnas

gl_c = grados de libertad de las columnas

Grados de libertad del residual (gl_R) :

$$gl_R = (c - 1) (r - 1)$$

gl_r = grados de libertad del residual

c = columnas

r = filas

Cuadrado medio del residual (C_{MR}) :

$$C_{MR} = R / gl_R$$

C_{MR} = cuadrado medio del residual

R = residual

gl_r = grados de libertad del residual

Análisis de varianza de las filas F₁ :

$$F_1 = C_{Mr} / C_{MR}$$

F₁ = varianza de las filas

C_{Mr} = cuadrado medio de las filas

C_{MR} = cuadrado medio del residual

Análisis de varianza de las columnas F_2 :

$$F_2 = C_{Mc}/C_{MR}$$

F_2 = varianza de las columnas

C_{Mc} = cuadrado medio de las columnas

C_{MR} = cuadrado medio del residual

Para determinar el coeficiente de variación:

Mé dia aritmética (\bar{X}) :

$$\bar{X} = x_1 + x_2 + \dots + x_n / N$$

\bar{X} = media aritmética

x = observación

N = número de observaciones

Desviación estándar (s) :

$$s = \sqrt{(x_1 - \bar{X})^2 + (x_2 - \bar{X})^2 + \dots + (x_n - \bar{X})^2} / N - 1$$

s = desviación estándar

x = valor de la observación

\bar{X} = media aritmética

N = número de observaciones

Coeficiente de variación (cv) :

$$cv = s \cdot 100 \bar{X}$$

cv = coeficiente de variación

s = desviación estándar

\bar{X} = media aritmética

Para determinar el valor de chi-cuadrado

Prueba de chi-cuadrado (χ^2):

$$\chi^2 = \frac{(o_1 - e_1)^2}{e_1} + \frac{(o_2 - e_2)^2}{e_2} + \dots + \frac{(o_n - e_n)^2}{e_n}$$

χ^2 = chi cuadrado

o_n = valor observado

e_n = valor teórico ó esperado

Tabla del análisis de varianza de los resultados obtenidos en el método usado en la valoración para la 3,5 dinitro o-toluamida en premezcla de alimento para aves.

	A	B	$\Sigma Tc+$	$\Sigma Tc+^2$	A^2	B^2
1	249.61	249.47	499.08	249080.85	62305.15	62235.28
2	247.32	246.85	494.17	244203.99	61167.18	60934.92
3	251.71	250.77	502.48	252486.15	63357.92	62885.59
4	245.14	246.09	491.23	241306.91	60093.62	60560.29
5	254.19	254.09	508.28	258348.56	64612.56	64561.73
6	252.78	251.71	504.49	254510.16	63897.73	63357.92
7	248.39	248.53	496.92	246929.49	61697.59	61767.16
8	243.81	243.96	487.77	237919.57	59443.32	59516.48
9	248.52	247.22	495.74	245758.15	61762.19	61117.73
10	250.69	250.67	501.36	251361.85	62845.48	62835.45
11	246.10	244.92	491.02	241100.64	60565.21	59985.81
12	253.05	253.71	506.76	256805.70	64034.30	64368.76
13	248.43	248.33	496.76	246770.50	61717.46	61667.79
14	249.18	248.53	497.71	247715.24	62090.67	61767.16
15	256.36	256.26	512.62	262779.26	65720.45	65669.19
T+r	3745.36	3741.11	7486.39		935310.83	933231.26
T_r²	14027122	13995904	56046035		Σ = 1868542.10	

Análisis de varianza

Suma de los cuadrados de las filas (Sr):

$$\frac{14027122}{15} + \frac{13995904}{15} - \frac{56046035}{30} =$$

$$935141.47 + 933060.27 - 1868201.2 = \underline{0.54 = Sr}$$

Suma de los cuadrados de las columnas (Sc):

249080.85	÷ 2	=	124540.43
244203.99	"	=	122102.00
252486.15	"	=	126243.08
241306.91	"	=	120653.46
258348.56	"	=	129174.28
254510.16	"	=	127255.08
246929.49	"	=	123464.75
237919.57	"	=	118959.79
245758.15	"	=	122879.08
251361.85	"	=	125680.93
241100.64	"	=	120550.32
256805.70	"	=	128402.85
246770.50	"	=	123385.25
247715.24	"	=	123857.62
262779.26	"	=	131389.63

$$\underline{1868538.60} - 1868201.2 = \underline{337.35 = Sc}$$

Suma total de los cuadrados (S_T):

$$1868542.10 - 1868201.20 = \underline{340.9 = S_T}$$

Análisis de la varianza:

	Suma de cuadrados	gl.	Cuadrado medio (C_M)
Filas	0.54	1	0.54
Columnas	337.35	14	24.10
Residual	3.01	14	0.22
Total	340.90	29	

Análisis de varianza de las filas F_1 :

$$F_1 = \frac{0.54}{0.22} = 2.45 \dots F_{0.95}(1,14) = \underline{4.60}$$

Análisis de varianza de las columnas F_2 :

$$F_2 = \frac{24.1}{0.22} = 109.54 \dots F_{0.95}(14,14) = \underline{2.46}$$

Estos son los resultados en el análisis de varianza del método de valoración de la 3,5 dinitro o-toluamida:
 $F_1 = 2.45$ que en comparación con el valor F de tablas (4.6) es menor, es decir, no significativo, por tanto es verdadera la hipótesis de la igualdad de las medias en un mismo lote.
 $F_2 = 109.54$ comparado con el valor de F de tablas (2.46) es mayor lo que indica que existe diferencia entre las medias de los distintos lotes estudiados.

Tabla del análisis del coeficiente de variación (cv)

	A	B	\bar{X}	$(x_1 - \bar{X})^2$	$(x_2 - \bar{X})^2$	s	cv
1	249.61	249.47	249.54	0.0049	0.0049	0.099	0.04
2	247.32	246.85	247.08	0.0576	0.0529	0.332	0.13
3	251.71	250.77	251.24	0.2209	0.2209	0.665	0.26
4	245.14	246.09	245.62	0.2304	0.2209	0.672	0.27
5	254.19	254.09	254.14	0.0025	0.0025	0.071	0.03
6	252.78	251.71	252.28	0.2500	0.3249	0.758	0.30
7	248.39	248.53	248.46	0.0049	0.0049	0.099	0.04
8	243.81	243.96	243.88	0.0049	0.0064	0.106	0.04
9	248.52	247.22	247.87	0.4225	0.4225	0.920	0.37
10	250.69	250.67	250.68	0.0001	0.0001	0.014	0.01
11	246.10	244.92	245.51	0.3481	0.3481	0.834	0.34
12	253.05	253.71	253.38	0.1089	0.1089	0.467	0.18
13	248.43	248.33	248.38	0.0025	0.0025	0.071	0.03
14	249.18	248.53	248.86	0.1024	0.1089	0.460	0.18
15	256.36	256.26	256.31	0.0025	0.0025	0.071	0.03

$$\bar{X}_{cv} = 0.15$$

Al efectuar los cálculos del coeficiente de variación de los resultados obtenidos en el método usado en la valoración de 3,5 dinitro o-toluamida se obtuvo como promedio el valor de 0.15.

Tabla del análisis de la prueba de chi-cuadrado

	A	B.	\bar{X}	o-e	$(o-e)^2$	$(o-e)^2/e$
1	249.61	249.47	249.54	-0.46	0.2116	0.0008
2	247.32	246.85	247.08	-2.92	8.5264	0.0341
3	251.71	250.77	251.24	1.24	1.5376	0.0062
4	245.14	246.09	245.62	-4.38	19.1844	0.0767
5	254.19	254.09	254.14	4.14	17.1396	0.0686
6	252.78	251.71	252.28	2.28	5.1984	0.0208
7	248.39	248.53	248.46	-1.54	2.3716	0.0095
8	243.81	243.96	243.88	-6.12	37.4544	0.1498
9	248.52	247.22	247.87	-2.13	4.5369	0.0181
10	250.69	250.67	250.68	0.68	0.4624	0.0018
11	246.10	244.92	245.51	-4.49	20.1601	0.0806
12	253.05	253.71	253.38	3.38	11.4244	0.0457
13	248.43	248.33	248.38	-1.62	2.6244	0.0105
14	249.18	248.53	248.86	-1.14	1.2996	0.0052
15	256.36	256.26	256.31	6.31	39.8161	<u>0.1593</u>

$$\chi^2 = 0.6877$$

Al realizar los cálculos de la prueba de chi-cuadrado de los resultados obtenidos en el método usado en la valoración de 3,5 dinitro o-toluamida se obtiene el valor redondeado igual a 0.7

Sulfaquanidina (47) (48)

Sinónimos: 4-amino-N-(amino imino metil)-bencensulfonamida; N'-amidinosulfanilamida; N'-guanilsulfanilamida; p-amidocensulfonil guanidina; sulfanililguanidina; guamida; sulfaguina; abiguanil; sulfamidinum; sulgin; diacta; ganidan; shigatox; suganyl.

Nombre de patente: guanecil; resulfon; ruocid.

Fórmula condensada: $C_7H_{10}N_4O_2S$

Peso molecular: 214.24

Fórmula desarrollada:



Descripción: Es un polvo cristalino blanco el cual se oscurece con la luz.

Punto de fusión: 190 - 192.5°C

Solubilidad: soluble 1 en 1000 de agua, 1 en 10 de agua hirviendo y 1 en 250 de etanol, casi insoluble en éter.

Espectro de absorción en infrarrojo: en pastillas de bromuro de potasio presenta los siguientes picos principales

A 1129, 1620 cm^{-1}

B 1230, 1537 cm^{-1}

Categoría terapéutica en veterinaria: antimicrobial en infecciones entéricas.

Técnica analítica de la valoración de N-p-aminobencensulfonil guanidina (sulfaguanidina).

Principio:

La determinación se basa en el método colorimétrico más común denominado Bratton-Marshall, en él, primero se efectúa la diazoación de la sulfonamida con la solución de nitrito de sodio en medio ácido, el exceso de nitrito de sodio se elimina con sulfamato de amonio y la copulación del compuesto diazoado se lleva a cabo con solución de diclorhidrato de N-naftilendiamina. La intensidad del complejo se mide en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 544 nm.

Material:

matraz volumétrico de 250 ml
matraz volumétrico de 200 ml
matraz volumétrico de 100 ml
matraces volumétrico de 25 ml
pipeta volumétrica de 10 ml
pipeta volumétrica de 5 ml
pipetas volumétricas de 1 ml
pipeta graduada de 25 ml
probeta de 100 ml

Reactivos:

mezcla de ácido clorhídrico: agua (1:200)
solución acuosa de ácido tricloroacético al 15%
++ solución acuosa de nitrito de sodio al 0.1%
++ solución acuosa de sulfamato de amonio al 0.5%
++ solución acuosa de diclorhidrato N-naftilendiamina 0.1%
estándar secundario de sulfaguanidina
++ preparación reciente.

Procedimiento para la valoración de la sulfaquanidina en premezcla de alimento para aves.

Pesar exactamente una cantidad de premezcla equivalente a 100 mg de principio activo (aproximadamente 1 g) e introducir en un matraz volumétrico de 250 ml, disolver con 100ml de la mezcla ácido clorhídrico:agua, la extracción se lleva a cabo con agitación mecánica durante 20 minutos, aforar con agua destilada y homogeneizar, se deja reposar durante 10 minutos, para que sedimente.

Del líquido sobrenadante tomar una alícuota de 25 ml y pasarla a un matraz aforado de 100 ml, añadir 18 ml de la solución de ácido tricloroacético al 15% que tiene por objeto la desproteínización de la muestra y llevar a volumen con agua destilada, homogeneizar. Filtrar sobre papel whatman #42, tomar una alícuota de 10 ml y transferirla a un matraz volumétrico de 100 ml aforando con agua destilada.

Para preparar la solución de referencia pesar exactamente una cantidad aproximada a los 40 mg del estándar secundario de sulfaquanidina e introducir a un matraz volumétrico de 200 ml, disolver con 100 ml de la mezcla de ácido clorhídrico:agua y llevar a volumen con agua destilada.

Para efectuar la reacción, tomar alícuotas de 5 ml de cada una de las soluciones (problema y referencia) y paralelamente realizar un blanco con 5 ml de agua destilada, éstas se transfieren a sus respectivos matraces volumétricos de 25 ml.

Adicionar a cada uno de los matraces 2 ml de la solución de ácido tricloroacético y una alícuota de 1 ml de la solución de nitrito de sodio al 0.1%, agitar y dejar reposar durante 3 minutos, añadir una alícuota de 1 ml de solución de sulfamato de amonio al 0.5%, agitar y dejar en reposo durante 3 minutos, enseguida tomar una alícuota de un ml de la solución de diclorhidrato N-naftilendiamina al 0.1% y adicionarla a cada uno de los matraces, agitar y dejar reposar por espacio de 10 minutos para que se desarrolle el color. Llevar las soluciones a volumen con agua destilada homogeneizar y leerlas en el espectrofotómetro a 544 nm.

Cálculos

$$\frac{A_p \times c_s}{A_s \times g_p} \times \text{F.D.} \times 1000 = \text{g/Kg de sulfaguanidina}$$

A_p = absorbancia del problema

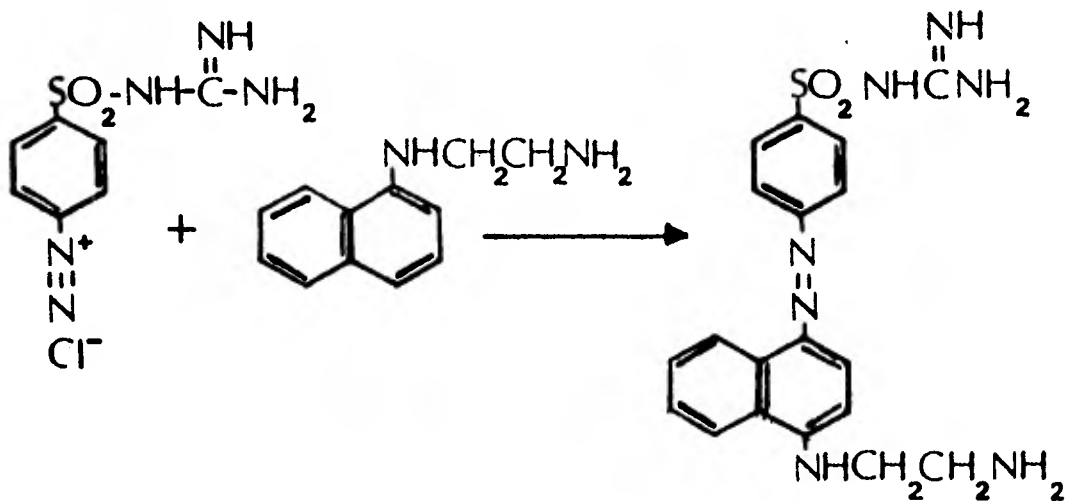
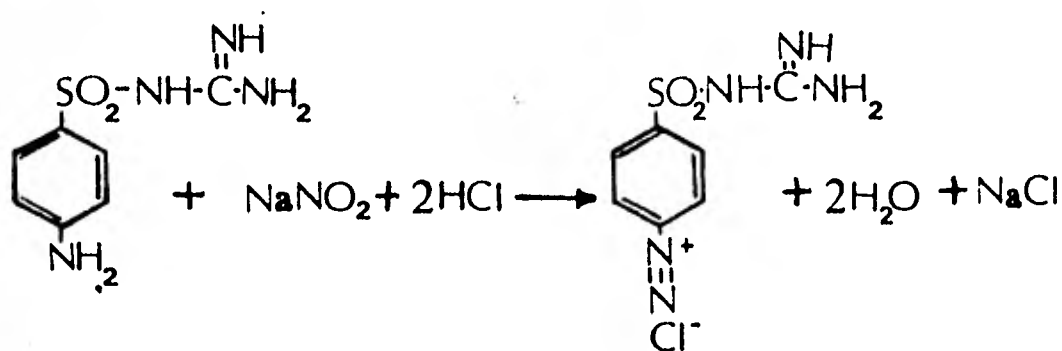
A_s = absorbancia del estándar

c_s = concentración en g/ml de la solución estándar

g_p = gramos del problema

FD = factor de dilución = 4000

Reacción que se efectua en la valoración de la sulfaguanidina.



Parte práctica:

Se eligieron 15 lotes de premezcla y se marcaron del número 1 al 15 (son los mismos lotes o muestras que se emplearon en la determinación de la 3,5 dinitro o-toluamida), el análisis del principio activo (sulfaguanidina) se realizó por duplicado en cada uno de los lotes.

Para el desarrollo de la técnica analítica ya descrita, los 15 lotes se dividieron también en 3 partes, por tanto, se trabajaron 5 lotes cada vez.

A continuación se presenta un cuadro con los resultados que se obtuvieron en los 15 lotes analizados y posteriormente el estudio estadístico que se efectuó en ellos.

Cuadro de resultados de la valoración del fármaco sulfaguanidina en premezcla de alimento para aves.

		C O L U M N A S					
		1	2	3	4	5	
F I L A S	A	101.71	103.35	99.17	101.04	99.60	g/Kg
	B	102.34	103.55	98.12	101.47	98.23	g/Kg

		C O L U M N A S					
		6	7	8	9	10	
F I L A S	A	103.67	98.92	98.69	103.32	103.37	g/Kg
	B	103.47	99.41	99.34	102.76	103.39	g/Kg

		C O L U M N A S					
		11	12	13	14	15	
F I L A S	A	99.14	99.36	101.29	97.26	101.06	g/Kg
	B	98.10	100.26	100.86	98.10	100.24	g/Kg

Las ecuaciones empleadas en el análisis estadístico son:

Medias de las columnas (Tc+):

$$T_{c+} = u_{1c} + u_{2c} + \dots + u_{nc} / n$$

Tc+ = media de las columnas

$u_{\#c}$ = resultado de la valoración en la columna c.

n = número de observaciones en cada categoría (columnas)

Media de las filas (T+r):

$$T+r = u_{r1} + u_{r2} + \dots + u_{rn} / n$$

T+r = media de las filas

$u_{r\#}$ = resultado de la valoración en la fila r.

n = número de observaciones en cada categoría (filas)

Suma de los cuadrados para estimar la varianza a partir de las columnas (Sc):

$$Sc = (u_{1c})^2/n + (u_{2c})^2/n + \dots + (u_{nc})^2/n - T_{c+}^2/N$$

Sc = suma de los cuadrados de las columnas

$(u_{\#c})^2$ = resultado de la valoración en la columna c elevado al cuadrado.

n = número de observaciones en cada categoría (columnas)

T_{c+}^2 = suma total de las observaciones al cuadrado

N = número total de observaciones

Suma de los cuadrados para estimar la varianza a partir de las filas (Sr):

$$Sr = (u_{r1})^2/n + (u_{r2})^2/n + \dots + (u_{rn})^2/n - T_{r+}^2/N$$

Sr = suma de los cuadrados de las filas

$(u_{r\#})^2$ = cuadrado del resultado de la valoración en la fila r

n = número de observaciones en cada categoría

T_{r+}^2 = cuadrado de la suma total de las observaciones

• N = número total de observaciones

Suma total de los cuadrados (S_T):

$$S_T = (u_1)^2 + (u_2)^2 + \dots + (u_n)^2 - T_{++}^2 / N$$

S_T = suma total de los cuadrados

$(u_{#})^2$ = cuadrado de cada una de las observaciones (c y r)

T_{++}^2 = cuadrado de la suma total de observaciones

N = número total de observaciones

Determinación del residual (R):

$$R = S_T - S_r - S_c$$

R = residual

S_T = suma total de los cuadrados

S_r = suma de los cuadrados de las filas

S_c = suma de los cuadrados de las columnas

Grados de libertad (gl):

$$gl = k - 1$$

gl = grados de libertad

k = categorías

Cuadrado medio de las filas (C_{Mr}):

$$C_{Mr} = S_r / gl_r$$

C_{Mr} = cuadrado medio de las filas

S_r = suma de los cuadrados de las filas

gl_r = grados de libertad de las filas

Cuadrado medio de las columnas (C_{Mc}):

$$C_{Mc} = S_c / gl_c$$

C_{Mc} = cuadrado medio de las columnas

S_c = suma de los cuadrados de las columnas

gl_c = grados de libertad de las columnas

Grados de libertad del residual (gl_R):

$$gl_R = (c - 1) (r - 1)$$

gl_R = grados de libertad del residual

c = columnas

r = filas

Cuadrado medio del residual (C_{MR}):

$$C_{MR} = R / gl_R$$

C_{MR} = cuadrado medio del residual

R = residual

gl_R = grados de libertad del residual

Análisis de varianza de las filas F_1 :

$$F_1 = C_{Mr} / C_{MR}$$

F_1 = varianza de las filas

C_{Mr} = cuadrado medio de las filas

C_{MR} = cuadrado medio del residual

Análisis de varianza de las columnas F_2 :

$$F_2 = C_{Mc} / C_{MR}$$

F_2 = varianza de las columnas

C_{Mc} = cuadrado medio de las columnas

C_{MR} = cuadrado medio del residual

Para determinar el coeficiente de variación

Media aritmética (\bar{X}):

$$\bar{X} = x_1 + x_2 + \dots + x_n / N$$

\bar{X} = media aritmética

x = observación

N = número de observaciones

Desviación estándar (s):

$$s = \sqrt{(x_1 - \bar{X})^2 + (x_2 - \bar{X})^2 + \dots + (x_n - \bar{X})^2} / N - 1$$

s = desviación estándar

x = valor de la observación

\bar{X} = media aritmética

N = número de observaciones

Coeficiente de variación (cv) :

$$cv = s \cdot 100 \bar{X}$$

cv = coeficiente de variación

s = desviación estándar

\bar{X} = media aritmética

Para determinar el valor de chi-cuadrado

Prueba de chi-cuadrado χ^2 :

$$\chi^2 = \frac{(o_1 - e_1)^2}{e_1} + \frac{(o_2 - e_2)^2}{e_2} + \dots + \frac{(o_n - e_n)^2}{e_n}$$

χ^2 = chi cuadrado

o_n = valor observado

e_n = valor teórico ó esperado

Tabla del análisis de varianzá de los resultados obtenidos en el método usado en la valoración de la sulfaguaniidina en premezcla de alimento para aves.

	A	B	$\sum Tc+$	$\sum Tc+^2$	A ²	B ²
1	101.71	102.34	204.05	41636.40	10344.92	10473.48
2	103.35	103.55	206.90	42807.61	10681.22	10722.60
3	99.17	98.12	197.29	38923.34	9834.69	9627.53
4	101.04	101.47	202.51	41010.30	10209.10	10296.16
5	99.60	98.23	197.83	39136.71	9920.16	9649.13
6	103.67	103.47	207.14	42906.98	10747.47	10706.04
7	98.92	99.41	198.33	39334.79	9785.17	9882.35
8	98.69	99.34	198.03	39215.88	9739.72	9868.44
9	103.32	102.76	206.08	42468.97	10675.02	10559.62
10	103.37	103.39	206.76	42749.70	10685.36	10689.49
11	99.14	98.10	197.24	38903.62	9828.74	9623.61
12	99.36	100.26	199.62	39848.14	9872.41	10052.07
13	101.29	100.86	202.15	40864.62	10259.66	10172.74
14	97.26	98.10	195.36	38165.53	9459.51	9623.61
15	101.06	100.24	201.30	40521.69	10213.12	10048.06
T+r	1510.95	1509.64	3020.59		152256.27	151994.93
T+r ²	2282969.9	2279012.9	9123963.9		$\sum = 304251.2$	

Análisis de varianza

Suma de los cuadrados de las filas (Sr):

$$\frac{2282969.9}{15} + \frac{2279012.9}{15} - \frac{9123963.9}{30} =$$

$$152197.99 + 151934.19 - 304132.13 = \underline{0.05} = Sr$$

Suma de los cuadrados de las columnas (Sc):

41636.40	2	=	20818.20
42807.61	"	=	21403.80
38923.34	"	=	19461.67
41010.30	"	=	20505.15
39136.71	"	=	19568.36
42906.98	"	=	21453.49
39334.79	"	=	19667.40
39215.88	"	=	19607.94
42468.97	"	=	21234.48
42749.70	"	=	21374.85
38903.62	"	=	19451.81
39848.14	"	=	19924.07
40864.62	"	=	20432.31
38165.53	"	=	19082.76
40521.69	"	=	20260.84
			<u>304247.13</u>

$$304247.13 - 304132.13 = 115 = Sc$$

Suma total de los cuadrados (S_T) :

$$304251.2 - 304132.13 = \underline{119.07} = S_T$$

Análisis de varianza

	Suma de cuadrados	gl	Cuadro medio (C _M)
Filas	0.05	1	0.05
Columnas	115.00	14	8.21
Residual	4.02	14	0.29
Total	119.07	29	

Análisis de varianza de las filas F_1 :

$$F_1 = \frac{0.05}{0.29} = \underline{0.17} \dots \dots \dots F_{0.95}(1,14) = \underline{4.60}$$

Análisis de varianza de las columnas F_2 :

$$F_2 = \frac{8.21}{0.29} = 28.31 \dots \dots \dots F_{0.95}(14,14) = \underline{2.46}$$

Los resultados en el análisis de varianza del método de valoración de la sulfaguanidina son:

$F_1 = 0.17$ que comparado con el valor F de tablas es menor, es decir, no significativo, siendo verdadera la hipótesis de la igualdad de las medias en un mismo lote.

$F_2 = 28.31$ que en comparación con el valor F de tablas es mayor por tanto se puede asegurar que existe diferencia entre las medias de los distintos lotes estudiados.

Tabla del análisis del coeficiente de variación cv

	A	B	\bar{X}	$(x_1 - \bar{X})^2$	$(x_2 - \bar{X})^2$	s	cv
1	101.71	102.34	102.02	0.0961	0.1024	0.445	0.44
2	103.35	103.55	103.45	0.0100	0.0100	0.141	0.14
3	99.17	98.12	98.64	0.2809	0.2704	0.742	0.75
4	101.04	101.47	101.26	0.0484	0.0441	0.304	0.30
5	99.60	98.23	98.92	0.4624	0.4761	0.969	0.98
6	103.67	103.47	103.57	0.0100	0.0100	0.141	0.14
7	98.92	99.41	99.16	0.0576	0.0625	0.346	0.35
8	98.69	99.34	99.02	0.1089	0.1024	0.460	0.46
9	103.32	102.76	103.04	0.0784	0.0784	0.396	0.38
10	103.37	103.39	103.38	0.0001	0.0001	0.014	0.01
11	99.14	98.10	98.62	0.2704	0.2704	0.735	0.74
12	99.36	100.26	99.81	0.2025	0.2025	0.636	0.64
13	101.29	100.86	101.08	0.0441	0.0484	0.304	0.30
14	97.26	98.10	97.68	0.1764	0.1764	0.594	0.61
15	101.06	100.24	100.65	0.1681	0.1681	0.580	0.58

$$\bar{X}_{cv} = 0.45$$

Al efectuar los cálculos del coeficiente de variación de los resultados obtenidos en el método usado para la valoración de la sulfaguanidina éste es igual a 0.45

Tabla del análisis de la prueba de chi-cuadrado

	A	B	\bar{X}	o-e	$(o-e)^2$	$(o-e)^2/e$
1	101.71	102.34	102.02	2.02	4.0804	0.0408
2	103.35	103.55	103.45	3.45	11.9125	0.1191
3	99.17	98.12	98.64	-1.36	1.8496	0.0185
4	101.04	101.47	101.26	1.26	1.5876	0.0159
5	99.60	98.23	98.92	-1.08	1.1664	0.0117
6	103.67	103.47	103.57	3.57	12.7449	0.1274
7	98.92	99.41	99.16	-0.84	0.7056	0.0070
8	98.69	99.34	99.02	-0.98	0.9604	0.0096
9	103.32	102.76	103.04	3.04	9.2416	0.0924
10	103.37	103.39	103.38	3.38	11.4244	0.1142
11	99.14	98.10	98.62	-1.38	1.9044	0.0190
12	99.36	100.26	99.81	-0.19	0.0361	0.0004
13	101.29	100.86	101.08	1.08	1.1664	0.0117
14	97.26	98.10	97.68	-2.32	5.3824	0.0538
15	101.06	100.24	100.65	0.65	0.4125	<u>0.0041</u>

$$\chi^2 = 0.6456$$

Al realizar los cálculos de la prueba de chi cuadrado de los resultados obtenidos en el método usado para la valoración de la sulfaguanidina y redondeando el valor, éste es igual a 0.65.

IV CONCLUSIONES

Conclusiones para el principio activo 3,5 dinitro o-toluamida en premezcla de alimento para aves.

Al efectuar el análisis de varianza de los datos obtenidos en el método de valoración de 3,5 dinitro o-toluamida se observa:

a) Las diferencias en F_1 no son significativas (F_1 obtenido igual a 2.45 y F de tablas 4.6) por tanto pertenecen a una misma población.

b) Las diferencias en F_2 son significativas (F_2 obtenido igual a 109.54 y F de tablas 2.46) por tanto el método analítico sirve para diferenciar a lotes de fabricación a fabricación.

c) En la prueba de chí cuadrado se obtuvo el valor de 0.7 el cual nos indica que los resultados obtenidos no difieren significativamente del teórico esperado.

d) El coeficiente de variación obtenido es igual a 0.15 por tanto no significativo.

Conclusiones para el principio activo sulfaguanidina en premezcla de alimento para aves.

Al efectuar el análisis de varianza de los datos obtenidos en el método de valoración de sulfaguanidina se tiene:

a) Las diferencias en F_1 no son significativas (F_1 experimental 0.17 y F de tablas 4.6) por tanto pertenecen a la misma población.

b) Las diferencias en F_2 son significativas (F_2 experimental 28,31 y F de tablas 2.46) por tanto se concluye que se pueden diferenciar las muestras de fabricación a fabricación.

c) Realizando en los datos obtenidos la prueba de chi cuadrado se tiene el valor de 0.65 por tanto los resultados prácticos no difieren significativamente del teórico esperado.

d) El coeficiente de variación experimental es igual a 0.45 por lo que se concluye que no varía significativamente.

V BIBLIOGRAFIA

1. Davies, S. F. M., Joyner L. P. and Kendall B. S. Coccidiosis. Printed in Great Britain by Oliver and Boyd Ltd., Edinburgh, 1963.
2. Hammond, Datus M. and Peter L. Long. The Coccidia, Eimeria, Isospora, Toxoplasma and related Genera. International Publishers in Science and Medicine. University Park Press, 1973.
3. Kheisin, Yevgeniy Mineevich. Life Cycles of Coccidia of Domestic Animals. International Publishers in Science and Medicine. University Park Press, 1972.
4. Biester, H. E. and Schwarte L. H. Enfermedades de las Aves. Unión Tipográfica Editorial Hispano Americana UTEHA. México D.F., 1964.
5. Noble, Elmer R. y Noble Glenn A. Parasitología. Editorial Interamericana S. A., México D.F., 1965.
6. Levine, N. D. Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man. Burgess Publishing Co. Minnesota Long P. L., 1963.
7. Krull, W. H. Notes in Veterinary Parasitology. Lavrence University. U. S. A., 1969.
8. Moreno, Díaz Reynaldo V. "Estudio Comparativo del Efecto de 4 Medicamentos Anticoccidianos sobre la Absorción de Carotenos en Pollos Inoculados con *E. tenella*, *E. necatrix* y *E. acervulina*". Tesis Fac. Med. Vet y Zoo., México D.F., 1977.
9. Bruggemann, J. and Jurgen S. "Are animal feed additives hazardous to human health?". Agr. and Food Che. 11 (1963), (5) 367-71.
10. Bevirt, and Thiigs. "Zoalene and ANOT residues in chickens feed and various antibiotics". Poultry Sei. 40 (1961), 1335-41
11. Stevens, S. G. "The determination of dinitolmide (zoalene) in animal feeds". Analyst (London) 94 (1969), 1159-63 .
12. Grant, N. S. "Determination of 3,5 dinitro o-toluamide in feed concentrates". J. Agr. Food Che. 8 (1960), 224-6.
13. Mehner, Torges. "Der Einflub von zoalene auf legeleistung und eiquali tat". Arch Gefluegelk 28 (1964), (5) 316-25.
14. Luchmann, "Levels of tolerance for various coccidiostatic agents in feed for growth of goslings". Arch Gefluegelk 28 (1964), (5) 368-77.

15. Mc Dougald, L. R. and Galloway. "Anticoccidial drugs: Effects on infectivity and survival intracellularly of *E. tenella* sporozoites" Exp. Parasitol. 40 (1976), 314-9.
16. Morrison, W. D. A. E. Ferguson. "Efficacy of various drugs for the prevention of experimentally induced coccidiosis in chickens". Poultry Sci. 46 (1967), 391-6.
17. Mc. Loughlin, D. K. and Gardiner J. L. "Drug resistance in *E. tenella* I. The experimental development of a glycarbylamide resistance strain". J. Parasitol. 47 (1961), 1001-6
18. Mc. Loughlin, D. K. and Gardiner J. L. "Drug resistance in *E. tenella* II. The experimental development of a zoalene resistant strain" J. Parasitol. 48 (1962), 341-6.
19. Gardiner, J. L. and Mc. Loughlin D. K. "Drug resistance in *E. tenella* III. Stability of resistance to glycarbylamide". J. Parasitology 49 (1963 a), 657-9.
20. Gardiner, J. L. and Mc. Loughlin D. K. "Drug resistance in *E. tenella* IV. The experimental development of a nitrofurazone resistant strain". J. Parasitol. 49 (1963 b), 947-50.
21. Warren, E. W. Ball S. J. and MacKENZIE D. R. "The incidence of drug resistance strain of *E. species* in chickens in Great Britain 1964-5". Brit Vet. J. 122 (1966), 534-43.
22. Siegmann, O. "Serienpassage eines *E. tenella* Stammes durch Kuken unter der Einwirkung von amprolium, glycamid, nitrofurazon und 3,5 dinitro o-toluamide". Deutsche Tierärztliche Woehenschrift 79 (1966), 268-71.
23. Mc. Loughlin D. K. and Gardiner J. L. "Drug resistance in *E. tenella* V. The experimental development of a nicarbazin resistant strain". J. Parasitol. 53 (1967), 930-2.
24. Mc Loughlin D. K. and Gardiner J. L. "Drug resistance in *E. tenella* VI. The experimental development of an amprolium resistant strain". J Parasitol. 54 (1968), 582 -4.
25. Klimes, B. "Resistance development of *E. tenella* to some coccidiostats (6-azauracil, nitrofurazone, zoalene, amprolium)". Acta Vet (Brno) 38 (1969), 101-8.
26. Smith, N. Thiëgs, Ludwig. "Identification of the metabolites of 3,5 dinitro o -toluamide C¹⁴ (zoalene) in chicken tissues". J. Agr. Food Che. 11 (1963), 253-6.
27. Smith, G. "Pathways for the metabolism of 3,5 dinitro o-toluamide (zoalene) in chickens". Anal Bioch. 7 (1964), 461-71.

28. Pregl, . Quantitative Organic Microanalysis. 4a. Ed.,
Blakeston Phyladelphia, p 33, 1951.
29. Dumas, . Quantitative Organic Microanalysis. 4a. Ed.,
Blakeston Phyladelphia, p 63, 1951
30. Knapstein, H. "Detection and determination of furoxone
in the presence of other coccidiostats in feed,
(zoalene)". Z Anal. Chem 217 (1966), 181-8.
31. Hammond, Weston. "The detection of prophylactic drugs
in animal feeding stuffs by thin layer chromatogra_{ph}
phy". Analyst (London) 94 (1969), 921-4
32. Bories, G. F. "Identification simple de treize additifs
dans les aliments composes par chromatographie sur
couche mince". J. Chromatography 59 (1971), (2)
33. Vanderezee, Edgell. "Quantitative determination of aroma
tic nitro groups with tin". Anal. Chem 22 (1950)
NO. 4 572-4.
34. Grant, S. and Marlene\G. Swank. "Colorimetric reactions
of 3,5 dinitro o-toluamide and related compounds
with aliphatic diamines". Anal Chem. 32 (1960),
978-81.
35. Grant, S. "Colorimetric determination of 3,5 dinitro
o-toluamide and related dinitro compunds".
Anal Chem. 32 (1962), (1) 31-7
36. Thiëgs, "Collaborative study of the determination of
zoalene and ANOT in chickens." J. Assoc. Offic.
Anal Chem 49 (1966), (4) 708-11.
37. Thiëgs, "Methods of distinguishing zoalene ind its meta
bolite from other coccidiostats." J. Agr. Food Che.
10 (1962), 26-30.
38. Getzendaner, M. E. "Astudy of an improved method for
determination of zoalene in feeds." J. Assoc.
Offic. Anal. Che. 44 (1961), (26) 18-26
39. Getzendaner, M. E. "Zoalene in feeds." J. Assoc Offic
Agr. Chem 43 (1960), 287-90
40. Ioset, R.W. and Grant S. "Zoalene quality control for
the determination of zoalene in fresh feeds".
Down to Earth, Fall 1962.

41. Grant, S. "Determination of zoalene in freshly prepares feeds." Down Earth 18 (1962), 13-6.
42. Getzendaner, M. E. "Determination of zoalene in feeds, feed concentrates and premixes." J. Assoc. Offic. Agr. Che. 45 (1962), 294-8
43. Christopherson, H. "Automated determination of zoalene in feeds." A. Assoc. A. Chem. 52 (1969), (1) 93 - 101.
44. Severijne, Buizer. "Determination fo 3,5 dinitro o-tolua mide in feed stuffs and premixes." Analyst 100 - (1975), 482-4.
45. Fauth, Roecher. "Reduction of gem dinitro and trinitro compounds with titanium III chloride." Anal. Che. 33 (1961), (7) 894-6.
46. Higuchi. Takeru and Einar Brochmann-Hanssen. Pharmaceutical Analysis. Interscience Publishers, 1961.
47. Merck Index of Chemical and Drugs. Ninth Edition. Published by Merck & Co., Inc. Rahway, N. J., U.S.A.
48. Clarke E. G. C. Isolation and identification of drugs. London The Pharmaceutical Press (1969), 550, 1032.
49. Kolthoff I. M. Belcher R. Volumetric Analysis Vol. III. Interscience, New York (1957), 597 - 619.

La investigación bibliográfica previa a la realización del presente trabajo se efectuó en el Chemical Abstracts de 1923 a 1979.

El fármaco 3,5 dinitro o-toluamida aparece por primera vez en el 6 th. Collective Index vols. 54 y 55 y a la fecha se siguen publicando trabajos.

La siguiente información adicional puede ser de utilidad para quien desee profundizar más en el conocimiento del fármaco ya que es una revisión de títulos de artículos que versan sobre la 3,5 dinitro o-toluamida extraídos del Chemical Abstracts con número de registro 148 - 01 - 6, o-toluamida 3,5 dinitro, $C_8H_7N_3O_5$ de los años 1957 a 1961 volúmenes 51 y 55 reunidos en el 6 th. Collective Index y de 1962 (vol. 56) a 1979 (vol. 91).

- C.A. 54:15756b
 Fed. Register. Food additives permitted in animal feed or animal feed supplements. Zoalene, residues permitted in medicated poultry feed and in uncooked tissues of chickens. 25, 3837-8.
- C.A. 54:18196i
 Grant, N. S. and Marlene G. Swank. "Colorimetric reaction of 3,5 dinitro o-toluamide and related compounds with aliphatic diamines". Anal. Chem. 32 (1960), 978-81.
- C.A. 54:18827b
 Getzendaner, M. E. "Zoalene in feeds". J. Assoc. Agr. Chem. Offic. 43 (1960), 287-90.
- C.A. 54:23014g
 Peterson, E. H. "Anticoccidial drugs against experimental infections with *E. tenella* and *E. necatrix*". Poultry Sci 39 (1960), 739-45.
- C.A. 55:808h
 Joyner, L. P. "The coccidiostatic activity of 3,5 dinitro o-toluamide against *E. tenella*". Research Vet. Sci. 1 (1960), 363-70.
- C.A. 55:3870a
 Fed. Register. Food additives. Zoalene in medicated feeds. 25, dec. 23 1960. 13632.
- C.A. 55:7695i
 Getzendaner, M. E. and W. L. Garner. "A study of an improved method for determination of zoalene in feeds". J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 44 (1961), 18-26.
- C.A. 55:14155i
 Changes in official methods of analysis made at 74 th. annual meeting. Oct 10, 11 and 12 1960. J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 44 (1961), 133-60.
- C.A. 55:14750h
 Grant, N. S. "Determination of 3,5 dinitro o-toluamide (zoalene in feed concentrates)". J. Agr. Food. Chem. 8 (1960), 224-6.
- C.A. 55:19051a
 Fed. Register. Food additives. Zoalene (3,5 dinitro o-toluamide). 26, June 15 1960. 5369-70.
- C.A. 55:20244e
 Fed. Register. Food additives. Oleandomycin in chicken and turkey feed. 25, May 3 1960. 3838.

- C.A. 55:21410f
Grant N S., B. Thiels and Swank. "Determination of 3,5 dinitro o-tolua-
mide (zoalene in chickens tissues)". J. Agr. Food Che 9 (1961),
197-201.
- C.A. 56:10655c
Bevirt, J L and B J Thiels. "Zoalene and ANOT residues in chickens feed
zoalene and various antibiotics". Poultry Sci. 40 (1961), 1335-41.
- C.A. 56:15882c
Fed. Register. Food additives chlortetracycline; chlortetracycline with
zoalene. 27, 1962. 2313-4.
- C.A. 57:1332g
Fed. Register. Food additives, animal feed and animal feed supplement,
amprolium with penicillin and bacitracin. 27, apr 4, 1962. 3198-9.
- C.A. 57:2641c
Getzendaner, M E. "Determination of zoalene in feeds, feed concentrates
and premixes". J. Assoc. Offic. Agr. Che. 45 (1962), 294-8.
- C.A. 57:7757f
Kirsch, Houchschule. "The coccidiostatic action of zoalene in chicks".
Arch. Gefluegelk 26 (1962), 119-26.
- C.A. 57:12958i
Thiels. "Methods of distinguishing zoalene and its metabolite from other
coccidiostats". J. Agr. Food Che. 10 (1962), 26-30.
- C.A. 57:12963h
Fed. Register. Food additives antibiotics in cattle feed. 27, aug. 21,
1962. 8308-9.
- C.A. 57:15611a
Mc. Loughlin and Gardiner. "Drug resistance in *E. tenella* II. The experi-
mental development of a zoalene resistant strain." J Parasitology
48 (1962), 341-6.
- C.A. 58:3821g
Fed. Register. Reserpine; chlortetracycline; zoalene; amprolium. 27,
nov. 16, 1962. 11309-12.
- C.A. 58:3822h
Fed. Register. Food additives Zoalene in feed for chickens and turkeys.
27, nov 24, 1962. 11546-7.
- C.A. 58:4943e
Rosenberg, D W, W D Woodward and A E Kline. "Effect of two nitrofurans
and zoalene on poultry condemnations due to air sac disease".
J. Am. Vet. Med. Assoc. 141 (1962), 958-9.
- C.A. 58:9564b
Grant, N S. "Determination of zoalene in freshly prepared feeds".
Down Earth 18 (1962), 13-6.

C.A. 59:929e

Grant, N S. "The metabolism of 3,5 dinitro o-toluamide C¹⁴ zoalene in chickens". J. Agr. Food Che. 11 (1963), 247-51.

C.A. 59:929f

Grant, N S., Thiess. "The identification of 3,5 dinitro o-toluamide, and possible metabolites by paper chromatography". J. Agr. Food Che. 11 (1963), 251-3.

C.A. 59:929g

Grant, N S., Thiess. "Identification of the metabolites of 3,5 dinitro o-toluamide C¹⁴ (zoalene) in chicken tissue". J. Agr. Food Che. 11 (1963), 253-6.

C.A. 59:929h

Grant, N S., Thiess. "The isolation and identification of the amino nitro o-toluamide formed by the biological reduction of 3,5 dinitro o-toluamide". J. Agr. Food Che. 11 (1963), 257-60.

C.A. 59:5682e

Fed. Register. Food additives. Bacitracin, bacitracin zinc, zoalene, 28, may 1, 1963. 4295-8.

C.A. 59:10687b

Brueggerman J., Juergen Schole. "Are animal feed additives hazardous to human health?". J. Agr. Food Che 11 (1963), (5) 367-71.

C.A. 59:12079e

Fed Register. Food additives. Oxitetracycline, amprolium, zoalene. 28, aug 14, 1963. 8310-12.

C.A. 60:1035e

Fed Register. Food additives, amprolium, arsanilic acid, sodium arsanilate and zoalene in medicated feed. 28, oct 10, 1963. 10869-71.

C.A. 60:2864h

Palomo Coll Antonio L. "Toluamides preparation". Span 288, 894, june 21, 1963, Appl june 10 1963.

C.A. 60:5818h

Thiess, Smith. "The in vitro reduction of 3,5 dinitro o-toluamide". Anal Biochem. 7 (1964), (2) 199-206.

C.A. 60:12429d

Grant, N S. "Pathways for the metabolism of 3,5 dinitro o-toluamide (zoalene) in chickens". Anal Biochem. 7 (1964), (4) 461-71.

C.A. 61:3460g

Gardiner, J L. "Drug resistance in E tenella III. Stability of resistance to glycarbylamide". J. Parasitology 49 (1963), 675-9.

C.A. 61:7599g

Fed. Register. Food additives. Zoalene, penicillin bacitracin, arsanilic acid. 29, jun 30, 1964. 8210-1.

- C.A. 61:7599h
Fed. Register. Food additives. Zoalene, erythromycin, thiocyanate. 29,
June 10, 1964. 7461.
- C.A. 61:11071h
Sibalić, S., N. Knezevic and M. Jovanovic. "Comparative investigation of
prophylactic effects of amprolium, zoamix and nitrofurazone".
Acta Vet.(Belgrade) 13 (1963), (1) 29-35.
- C.A. 61:11265d
Thiess, B. J., Grant, Bevirt. "A.N.O.T.". Down Chem. Co. Midland Anal.
Methods Pesticides, Plant Growth, Regulators, Food Additives.
Gunter Zweig editor Academic 207-15, 221-6.
- C.A. 61:12544f
Fed. Register. Food additives. Zoalene, amprolium, hygromycin B, tylosin.
29, Sep 1 1964. 12461-3.
- C.A. 62:3131a
Sharma, Bora, Pathak. "The coccidiostatic effect of sodium sulfaquinoxaline,
nitrofurazone and furazolidone soluble and 3,5 dinitro o-toluamide
against natural infection of cecal coccidiosis in poultry".
Indian Vet. J. 41 (1964), (9) 583-92.
- C.A. 62:6868b
Mehner, Torges. "The effects of zoalene on the yield and quality of hens
eggs". Arch. Gefluegelk 28 (1964), (5) 316-25.
- C.A. 62:7038e
Luchmann, "Levels of tolerance for various coccidiostatic agents in the
feed for the growth of goslings". Arch. Gefluegelk 28 (1964). (5)
368-77.
- C.A. 63:1145c
Fed. Register. Food additives. Zoalene, amprolium, hygromycin B, tylosin,
penicillin. 30, May 7 1965. 6389-91.
- C.A. 63:6168a
Bondi, E., Sciavo. "Influence of some coccidiostats on the production of
antibodies to Newcastle disease virus". Atti. Soc. Ital. Sci. Vet.
18 (1964), 673-6.
- C.A. 63:18931e
Fed. Register. Food additives. Zoalene, 3-nitro-4 hydroxy phenyl arsonic
acid, penicillin bacitracin. 30, Oct 5 1965. 12670-3.
- C.A. 64:12469h .
Boehringer, S. "Water soluble derivate of 3,5 dinitro o-toluamide".
Poultry Sci 39 (1960), 739-45. Ger. Appl May 2 1964.
- C.A. 64:20531e
Knapstein, H. "Detection and determination of furoxone in the presence of
other coccidiostats in feed (zoalene)". Z. Anal. Chem. 217 (1966),
181-8.

- C.A. 65:17434d
Krylov, Gusev. "Coccidiostatic activity of some chemical preparations".
Veterinariya 43 (1966), (8) 69-70.
- C.A. 65:17597f
Thiegs, . "Collaborative study of the determination of zoalene and ANOT
in chickens." J Assoc. Offic. Agr. Che. 49 (1966), (4) 708-11.
- C.A. 66:9079f
Litjens, J B., J M Hendrick. "Intoxication in broilers caused by combi-
nation of 3,5 dinitro o-toluamide and furazolidone". Tijdschn Dier
jeneesk 90 (1965), (12) 862-9.
- C.A. 66:28551s
Merck & Co. INC. Benzamide-benzoate complexes. Neth Appl. 6,600,010
(C1.C.07c), July 12, 1966. U.S. Appl. Jan 11, 1965. 12 pp.
- C.A. 66:92768v
Grevel, E. "Coccidiostatic activity of zoalene in experimental infection
with E. acervulina". Tieraerztl Umsch 22-1, 25-6,31-3, (1967).
- C.A. 66:92799f
Artemichev M A., Scmulevich A I. "Chemoprophylaxis of experimental coc-
cidiosis of chicks by coccidine and its analogs in comparasion
with zoalene". Tr. Gos. Nauch-Kontr. Inst. Vet. Prep. 13 (1966),
414-17.
- C.A. 66:102838j
Morrison, W. D. , A E Ferguson. "Efficacy of various drugs for the pre-
vention of experimentally induced coccidiosis in chickens". Poultry
Sci. 46 (1967), (2) 391-6.
- C.A. 67:18911r
Brewer, "Efficacy of buquinolate againts six species of coccidia".
Poultry Sci. 46 (1967), (3) 642-6.
- C.A. 67:20775t
Fed Register. Food additives. Amprolium dienistrol diacetate, zoalene,
penicillin. 32, may 3 1967. 6775-7.
- C.A. 67:62923v
Krylov, G. "Efficiency of preparations againts experimental chicken coc-
cidiosis". Veterinariya 43 (1967), (4) 54-6.
- C.A. 67:72489x
Fed. Register. Food additives. Amprolium, arsanilic acid, erythromycin,
thiocyanate, ethopabate, zoalene. 32, jun 29, 1967. 9224-5.
- C.A. 67:99059u
Antkowiak, J J and Spatonico. "Thin layer chromatography of drugs in me-
dicated feeds". J. Chrom. 29 (1967), (1) 277-32.

- C.A. 68:86170 u
Fed Register. Food additives. Amprolium, arsanilic acid, erythromycin and zoalene. 33, feb 17, 1968. 3112-3.
- C.A. 68:20027 w
Maier, Dora and M Kirchgessner. "Vitamin B6 requirement of broiler chicks supplemented with coccidiostatic agent". Int. Z. Vitaminforsch 37 (1967), (3) 331-3
- C.A. 69:95187c
Fed Register. Food additives. Amprolium, oxytetracycline, zoalene. 33, sep 4 1968. 172; 12368
- C.A. 70:27779t
Fed Register. Food additives, zoalene. 33, nov 6 1968. (217), 16272-3.
- C.A. 70:56340y
Christopherson, H. "Drugs in feeds. Automated determination of zoalene in feeds". J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 52 (1969), (1) 93-101.
- C.A. 70:104084s
Sadler C, "Efficacy of buquinolate against artificial coccidiosis infection in broiler chickens." Poultry Sci. 47 (1968), (6) 1917-21.
- C.A. 71:33411d
Menachemoff, Emil. "Powdered coccidiostat composition containing 3,5 dinitro o-toluamide". S. African 6804, (1968), 319-20.
- C.A. 72:1996c
Williams, "B-glucuronidase activity in the urine, serum kidney and bladder of rats fed 3,5 dinitro benzamide". Food Cosmet. Toxicol. 7 (1969), (4) 333-8.
- C.A. 72:2232n
Fed Register. Food additives. Carbasone, zoalene. 34, oct. 14 1969. (197) 15793-4.
- C.A. 72:109762n
Acta, "Resistance development". Acta Vet. Brno. 38 (1969), (1) 101-8.
- C.A. 72:11417d
Hoodless, "Gas Chromatography". Analyst London 94 (1969), (1121) 670-3.
- C.A. 72:30333q
Hammond, "Detection of prophylactic drugs in animal feeding stuffs by thin layer chromatography". Analyst London 94 (1969), (1123) 921-4.
- C.A. 72:77497m
Stevens, S G. "Determination of zoalene in feeds". Analyst London 94. (1969), (1125) 1159-63.
- C.A. 72:97858h
Willard, R. "Efficacy studies on some new anticoccidial drugs". Acta Vet. Brno. 38 (1969), (1) 137-45.

- C.A. 73:95895q
Mc. Loughlin, Donald K. "Coccidiosis experimental analysis of drug resistance". Exp. Parasitol. 28, (1970), 129-36.
- C.A. 75:1982g
Vinters, Karlis. "Nitro compounds and their coccidiostatic activity". Probl. Parazitol. Pribaltike Mater. Nauch Koord Konf. 4th. (1968) (pub. 1970), 318-23.
- C.A. 75:1983h
Vinters, K. "Studies respect to zoalene". Probl. Parazitol. Pribaltike Mater Nauch. Koord Konf 4th. (1968) (pub1970) 341-4.
- C.A. 75:31813v
Mc. Loughlin, . "Drug resistance in E tenella. Restoration of drug sensitivity following exposure". J Parasitology 57 (1971), (2) 383-5.
- C.A. 75:85623b
Mc. Loghlin, D. "Efficacy of decoquinate againts 11 strains". Vet. Sci. Res. Dir. Agric. Res. Serv. Beltsville Avian Dis. 15 (1971), (2) 342-5.
- C.A. 75:87189p
Fed Register. Food additives. Oleandomycin and zoalene. 36, jul 14 1971, (135), 13089.
- C.A. 75:117188g
Bories, G. "Simple identification of 13 additives in mixed feed by thin layer chromatography". J Chromatography 59 (1971), (2) 467-71.
- C.A. 76:42250f
Krylov, V. "Resistance of E. tenella to coccidiostatic preparations". Veterinariya (Moscow) 48 (1971), (7) 72-3.
- C.A. 76:95519g
Koziak, B. "Eczema produced by contact with poultry feed mixtures". Prac. Lek. 23 (1971), (7) 240-4.
- C.A. 76:148557b
Hammel, R. "Determination of purity of compounds by extraction solubility" Talanta 19 (1972), (3) 353 -9.
- C.A. 77:223q
Malcolm, R. "Anticoccidial activity of monensin in floor pen experiments" Poultry Sci. 51 (1972), 139-46.
- C.A. 77:18482h
Maier, R. K. "Retention of major elements (calcium, phosphorus, magnesium, sodium, potasium) and trace elements (Fe, Cu, Mn, Zn, in broilers by adding coccidiostats". Zentralbl. Weterinaermed Reiche 19 (1972), (2) 111-6.

- C.A. 77:43154k
 Burow, H., Weiss H. "Further research into experimental generation of zoalene resistance in an *E. tenella* field strain". Berlin Muenchen Tieraerztl Wochenschr 85 (1972), (7) 127-32.
- C.A. 77:57116m
 Koblova, I. A., Shmulevich A I. "Iramine (3,5 dinitro anthranilic acid amide) as a new effective coccidiostatic". Tr. Gos. Nauch Kontr. Inst. Vet. Prep. 16 (1969), 316-19.
- C.A. 77:83408c
 Lacuata, Manuel Mauro. "Evaluation of the coccidiostatic effect of cycostatic, Amprol plus, N.F. 180 and Zoamix on broiler chicks raised on deep litter". J. Vet Med. 10 (1971) (2) 81-100.
- C.A. 77:124837n
 Hoequellet, Pierre, Pevendrart Annick. "Alternating current polarographic determination of 5 nitro drugs in animal feed. (zoalene, nitrofurazone, furazolidone, etc.)". Analisis 1 (1972), (3) 192-201.
- C.A. 78:136j
 Kowalski Larry, Reid W. Malcolm. "Roxarsone. Efficacy againts *E. brunetti* infections in chickens". Poultry Sci. 51 (1972), (5) 1586-9.
- C.A. 78:12110j
 Ryley, John, Wison Robert. "Comparative studies with anticoccidials and 3 species of chicken coccidia in vivo and in vitro". J. Parasitology 58 (1972), (4) 664-8.
- C.A. 78:110808n
 Piskov, V. "Concertion of carboxilic acids to amides". Zh. Prikl. Khim. (Leningrad) 46 (1973), (1) 220-1.
- C.A. 78:134282n
 Jahn, F. "Experimental study on methamoglobin formation in white rats after administration of the aromatic nitro compounds, zoalene, nicarbazin". Wien Tieraerztl Monastsschr 59 (1972), (10) 321-3.
- C.A. 79:27105f
 Matsuzawa, Toshiaky, Suzuky Yoshio. "Coccidiostatic activity of beclotiamine (cocciden) againts a single infection of 5 species of *Eimeria* in chickens". Sankyo Kenkyusho Nempo 24 (1972), 136-42.
- C.A. 79:30537d
 Barefield, Lewis. "Qualitative identification of furazolidone, tylosin and zoalene in feeds". J. Ass. Off. Anal. Che. 56 (1973), (3) 762-4.
- C.A. 79:87363y
 Keppens, L. "Incorporation of coccidiostat cycostat in feed for broilers". Rev. Agr. (Brussels) 26 (1973), (1) 189-96.
- C.A. 79:100291v
 Ciupitoiu, A., Vasilescu V. "Determination of 3,5 dinitro o-toluamide by spectrometry". Rev Chim. (Bucharest) 24 (1973), (4) 295-8.

- C.A. 79:111522y
Koblova, I. A., Piskov V. B. "Coccidiostatic of 3,5 dinitro benzamide analogs". Khim. Sel. Khoz. 11 (1973), (7) 551-4.
- C.A. 79:13540k
Restuccia, A., Di Matte. "Residues of zoalene in chickens fed medicated feed". Vet. Ital. 24 (1973), (1-2) 27-34.
- C.A. 80:69382v
Van der Waals,. "Stability of drugs in feeds. Effects of processing on a number of antibiotics and coccidiostats when these are incorporated in pelleted feeds". Tijdschr Diergeneesk 98 (1973), (18) 853-60.
- C.A. 80:132938y
Sitzmann, Michael E. "Chemical reduction of 2,4,6 trinitro toluene. Initial products." J. Chem. Eng. Data 19 (1974), (2) 179-81.
- C.A. 80:137221u
Piskov, V. B., Kazakova V. M. "Analytical importance of the reaction of aromatic nitro compounds with ethylenediamine". Tr. Gos. Nauch. Kontr Inst. Vet. Prep. 18 (1972), 361-70.
- C.A. 81:72946h
Soltys, Adam, Wojton Teresa. "Drug resistance of E. tenella againsts some coccidiostatics". Med. Wet. 30 (1974), (5) 273-5.
- C.A. 82:31166f
Panculescu, Petre, Semo Nora M. " Dinitrotoluanides". Rom. 57,004 (C1-C-07c), 20 may 1974. Appl 66 113, 01 mar. 1971, 2 pp.
- C.A. 82:68279w
Shingr, Ito Tsunoda, Kiyoshi Nishikawa. "Effects of robenidine and some other drugs on mice experimentally infected with toxoplasma." Natl. Inst. Anim. Health. 14 (1974), (3) 129-36.
- C.A. 82:132874r
Chapman, H. "Use of chick embryo infections for the study of drug resistance in E. tenella". Parasitology 69 (1974), (3) 283-90.
- C.A. 83:1379f
Chubis, A. I. "Resistance of E. acervulina to statil, 3,5 dinitro benzamide and acynidrazone". Veterinariya 61 (1975), (1) 61-2.
- C.A. 83:22278n
Plotnikov, A. S. "Epizootiology and chemical prevention of chicken coccidiosis in the Irkutsk Region". Sib. Vestn S-Kh. Nauki 4 (1974), (6) 53-6.
- C.A. 83:130106p
Severijnen, M. Buizer. "Determination of 3,5 dinitro o-toluanide in feed-stuffs and premixes". Analyst (London) 100 (1975), (1192) 482-4.

- C.A. 83:141784j
Miltrovic, M. "Comparative anticoccidial activity and compatibility of lasalocid in broiler chickens". Poultry Sci 54 (1975), (3) 757-61.
- C.A. 83:157792w
Khalikov, F. R. "Quantitative and qualitative changes of amino acids in muscles of zoalene treated chicks". Tr. Uzb. Nauchno-Issled Vet. Inst 22 (1974), 93-5.
- C.A. 84:3955f
Fed Register. Animal drugs. Feeds and related products, reorganization and republication". 15 march 1976. 41 (51). 10984-1012.
- C.A. 85:19613d
Potter, I M. "A report on turkey nutrition research conducted at Virginia Polytechnic Institute". Feedstuffs 48 (1976), (18) 32-4.
- C.A. 85:76450x
Fed Register. Antibiotic, nitrofurans and sulfonamide drugs in animal feeds. 41 (38), 25 feb 1976. 8282-312.
- C.A. 85:103840h
Reid, W. M. "Coccidiosis: effects of high environmental temperatures on anticoccidial protection". Poultry Sci. 55 (1976), (4) 1436-41.
- C.A. 85:122088k
Canton, J. H. "The short term toxicity of some feed additives to different fresh water organisms". Bull. Environ. Contam. Toxicol. 15 (1976), (6) 720-5.
- C.A. 86:25842q
Morisawa, Yasuhiro. "Studies on anticoccidial agents 10. Synthesis and anticoccidial activity of 5-nitro nicotinamide and its analogs". J. Med. Chem. 20 (1977), (1) 129-33.
- C.A. 86:50520r
Mc. Dougal, L. R. "Anticoccidial drugs, effects on infectivity and survival intracellularly of *E. tenella* sporozoites". Exp. Parasitol 40 (1976), (3) 314-19.
- C.A. 86:83602x
Wojton, . "Effectiveness of some coccidiostats in the control of *E. necatrix* in poultry". Med. Veter. 32 (1976), (12) 741-2.
- C.A. 86:88070g
Harms, R. H. "Effect of flavomycin and 3-nitro-10 on broiler pigmentation when used with different coccidiostats. 3 monensis and zoalene". Poultry Sci. 55 (1976), (6) 2214-17.
- C.A. 86:115017d
Ryley, J. F., Wilson R. G. "Laboratory studies with some older anticoccidials". Parasitology 73 (1976), (3) 287-309.

- C.A. 87:20736u
Fed Register. New animal drugs for use in animal feeds. Bambermycins, zoalene and androxarsone. 42 (78), Apr. 22 1977. 20817-18.
- C.A. 87:183144p
Kling, H. F. "Response of broilers to diets containing bambermycins, roxarsone and zoalene". Poultry Sci. 56 (1977), (3) 854-8.
- C.A. 88:31917a
Joyner, L. P. "The anticoccidial effects of amprolium, dinitolmide and monensin against *E. maxima*, *E. brunetti* and *E. acervulina* with particular reference to oocyst sporulation". Parasitology 75 (1977), (2) 155-64.
- C.A. 89:140080p
Comm., "Identification of prophylactic and growth promoting drugs in animal feedstuffs". Chemical Society Analytical Methods. Analyst (London) 103 (1978), (1226) 513-20.
- C.A. 89:190907j
Karlssoon, "Development of immunity to coccidiosis in chickens administered anticoccidials in feed". Avian Dis. 22 (1978), (3) 487-95.
- C.A. 89:220938q
Hrdlička, Liri. "Qualitative identification of coccidiostatics in feed". Biol. Chem. Zivocisne Vyroby-Vet. 14 (1978), (3) 233-6.
- C.A. 90:80441r
Kinichi, Imai. "Recent anticoccidioidomycosis agents". Farumashia 14 (1978), (8) 676-80.
- C.A. 90:102046v
Nose, N., Hoshino Y., Kikuchi Y. "Studies on residues of synthetic antibacterials in livestock products. I Analytical method for 3,5 dinitro o-toluamide by gas chromatography". Shokuhin Eiseigaku Zasshi 19 (1978), (3) 323-8.
- C.A. 90:109107z
Quinot, E., Moncelon. "Toxic substances in the air. Determination method for calculation of exposure limit value". Cah. Notes Doc. 93 (1978), 547-65.
- C.A. 90:166618r
Imanaka, Matsunaga. "Hygienic studies on toxicants in foods part.3. Analytical methods for zoalene in chickens and eggs". Okayama-Ken Kankyo Hoken Senta Nempo 2 (1978), 182-6
- C.A. 90:166636v
Winchester, R. "Concurrent determination of residues of the coccidiostats aklomide y zoalene in poultry meat". N. Z. J. Sci 21 (1978), (4) 553-5
- C.A. 91:49300r
Bartov, . "Protective effect of nicarbazin, zoalene and amprolium encephalopathy" Poultry Sci. 58 (1979), (3) 597-601.