



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Química

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA ANÁLISIS DE UN FUNGICIDA (PROPINEB) POR
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN PARA SEGUIMIENTO DE LA
MEJORA CONTINUA EN UN SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD**

José Estuardo Lira Sosa

Asesorado por el Ing. Héctor Federico Fuentes Saquich

Guatemala, septiembre de 2012

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA ANÁLISIS DE UN FUNGICIDA (PROPINEB) POR
CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN PARA SEGUIMIENTO DE LA
MEJORA CONTINUA EN UN SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA
POR

JOSÉ ESTUARDO LIRA SOSA

ASESORADO POR EL ING. HÉCTOR FEDERICO FUENTES SAQUICH

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO

GUATEMALA, SEPTIEMBRE DE 2012

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

DECANO	Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
VOCAL I	Ing. Alfredo Enrique Beber Aceituno
VOCAL II	Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
VOCAL III	Ing. Miguel Ángel Dávila Calderón
VOCAL IV	Br. Juan Carlos Molina Jiménez
VOCAL V	Br. Mario Maldonado Muralles
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANO	Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
EXAMINADOR	Ing. Carlos Salvador Wong Davi
EXAMINADOR	Ing. Manuel Gilberto Galván Estrada
EXAMINADORA	Inga. Hilda Piedad Palma Ramos
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA ANÁLISIS DE UN FUNGICIDA (PROPINEB) POR
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN PARA SEGUIMIENTO DE LA
MEJORA CONTINUA EN UN SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD**

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha 1 de junio de 2011.



José Estuardo Lira Sosa

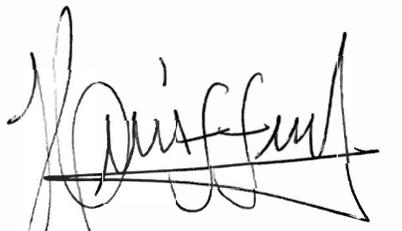
Guatemala 10 de mayo de 2012

Ingeniero
Williams Guillermo Álvarez Mejía
Director Escuela de Ingeniería Química
Universidad De San Carlos De Guatemala

Por este medio hago constar que he revisado y aprobado el Informe Final del Trabajo de Graduación del estudiante JOSÉ ESTUARDO LIRA SOSA, con carné 2006 – 11124, el cual se titula: **“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA ANÁLISIS DE UN FUNGICIDA (PROPINEB) POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN PARA SEGUIMIENTO DE LA MEJORA CONTINUA EN UN SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD”**

En base a lo anterior, lo someto a su consideración a efecto de continuar con el trámite respectivo para continuar con su aprobación.

Atentamente



Ing. Qco. Héctor Federico Fuentes Saquich
ASESOR
Colegiado 1655

Héctor Federico Fuentes Saquich
Ingeniero Químico
Colegiado 1655



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

Guatemala, 31 de mayo de 2012
Ref. EI.Q.258.2012

Señores
Área de Lingüística
Facultad de Ingeniería
Presente,

Estimados Señores:

Como consta en el Acta TG-176-2011-IF le informo que reunidos los Miembros de la Terna nombrada por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del:

INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

Solicitado por el estudiante universitario: **José Estuardo Lira Sosa**

Identificado con número de carné: **2006-11124**

Previo a optar al título de INGENIERO QUÍMICO.

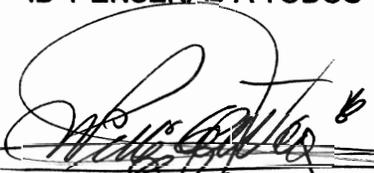
Siguiendo los procedimientos de revisión interna de la Escuela de Ingeniería Química, los Miembros de la Terna han procedido a **APROBARLO** con el siguiente título:

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA ANÁLISIS DE UN FUNGICIDA (PROPINEB) POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN PARA SEGUIMIENTO DE LA MEJORA CONTINUA EN UN SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD

El Trabajo de Graduación ha sido asesorado por el Ingeniero: **Héctor Federico Fuentes**.

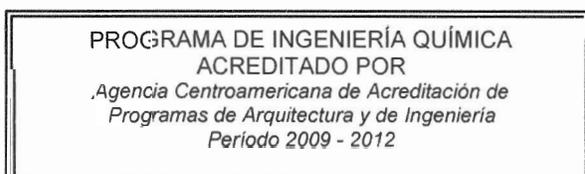
Habiendo encontrado el referido informe final del trabajo de graduación **SATISFACTORIO**, se autoriza al estudiante, proceder con los trámites requeridos de acuerdo a las normas y procedimientos establecidos por la Facultad para su autorización e impresión.

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"


Ing. Williams Guillermo Álvarez Mejía C. Dr.
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química



C.c.: archivo





El Director de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer el dictamen del Asesor y de los Miembros del Tribunal nombrado por la Escuela de Ingeniería Química para revisar el Informe del Trabajo de Graduación del estudiante, **JOSÉ ESTUARDO LIRA SOSA** titulado: **"VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA ANÁLISIS DE UN FUNGICIDA (PROPINEB) POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN PARA SEGUIMIENTO DE LA MEJORA CONTINUA EN UN SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD"**. Procede a la autorización del mismo, ya que reúne el rigor, la secuencia, la pertinencia y la coherencia metodológica requerida.

"Id y Enseñad a Todos"


Ing. Víctor Manuel Monzón Valdez
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química



Guatemala, septiembre de 2012

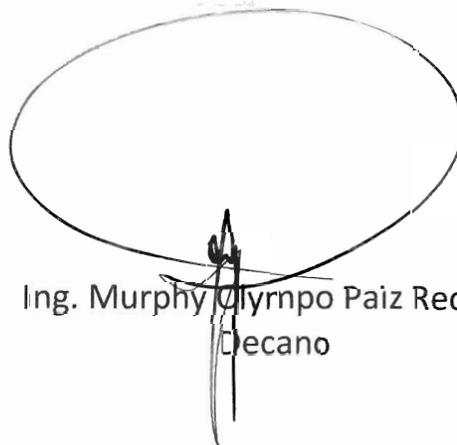
Cc: Archivo
VMMV/ale



DTG. 450.2012

El Decano de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al trabajo de graduación titulado: **VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA ANÁLISIS DE UN FUNGICIDA (PROPINEB) POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN PARA SEGUIMIENTO DE LA MEJORA CONTINUA EN UN SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD**, presentado por el estudiante universitario **José Estuardo Lira Sosa**, autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE:



Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
Decano



Guatemala, 18 de septiembre de 2012.

/gdech

ACTO QUE DEDICO A:

Dios

Por brindarme fortaleza en los momentos difíciles y sabiduría para tomar decisiones. Gracias por las bendiciones que le has dado a mi vida. A tí toda la gloria por el logro alcanzado. *"Si estimáis la gloria, buscadla en la única verdadera, que es Dios." (San Ignacio de Loyola).*

Mis padres

Edgar Lira e Iracema Sosa por ser mi inspiración en todo momento, mis mentores y la piedra angular de lo que soy como persona. Gracias por su amor y apoyo incondicional recibido en todo momento a lo largo de mi vida. Ustedes hacen que yo dé lo mejor de mí. Los amo mucho.

Mis hermanos

Luis, Renato y David por los consejos, el apoyo y los grandes momentos en familia. Los admiro mucho, gracias por ser mis mejores amigos.

Mis amigos

Un papel no bastaría para mencionarlos a todos y expresarles mi cariño sincero. Gracias por los buenos recuerdos que han dejado en mí y por el viaje que emprendimos hace tiempo.

**Universidad de San
Carlos de Guatemala**

Por ser mi *alma matter*, por brindarme educación, valores con sentido social y la oportunidad de conocer a grandes personas dentro de esta institución. Orgulloso de ser sancarlista.

Facultad de Ingeniería

Por darme la oportunidad de crecer académicamente y formarme como profesional de la ingeniería.

**Escuela de Ingeniería
Química**

Por las enseñanzas brindadas hacia mi persona.

AGRADECIMIENTOS A:

Ing. Federico Fuentes

Por compartir su conocimiento sin egoísmo y su colaboración en la realización de este trabajo de graduación. Por su tiempo y paciencia, siempre agradecido.

**Juan López, Oliver Rivera
William De Paz**

Por brindarme su conocimiento y las bases para realizar la investigación. Porque los conocimientos van más allá de un título.

Inga. De León Arana

Por su ayuda y colaboración en la elaboración de este trabajo de graduación.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	V
LISTA DE SÍMBOLOS	XI
GLOSARIO	XIII
RESUMEN	XVII
OBJETIVOS.....	XIX
INTRODUCCIÓN	XXI
1. ANTECEDENTES.....	1
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1. Validación.....	8
2.1.1. ¿Por qué validar?.....	10
2.1.2. Ensayos para la validación de un método analítico.....	10
2.2. Breve introducción a la cromatografía.....	13
2.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	14
2.3.1. Cromatografía de fase normal.....	15
2.3.2. Cromatografía de fase inversa	15
2.3.3. Cromatografía de exclusión por tamaño	17
2.3.4. Cromatografía de intercambio iónico.....	17
2.3.5. Cromatografía de bioafinidad	18
2.3.6. Características HPLC.....	18
2.4. Propineb.....	19
2.4.1. Información especializada.....	19

3.	DISEÑO METODOLÓGICO	23
3.1.	Variables.....	23
3.2.	Delimitación del campo de estudio	23
3.3.	Recursos humanos disponibles	24
3.4.	Recursos materiales disponibles	24
3.4.1.	Reactivos y muestras.....	24
3.4.2.	Equipo y cristalería	25
3.5.	Técnica cuantitativa	26
3.6.	Recolección y ordenamiento de la información	27
3.7.	Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información	28
3.7.1.	Determinación de las condiciones del método propuesto	28
3.7.2.	Preparación de soluciones.....	29
3.7.3.	Calibración de equipo	29
3.7.3.1.	Procedimiento	29
3.7.3.2.	Material y equipo.....	30
3.7.3.3.	Reactivos	31
3.7.4.	Análisis de muestras por cromatografía líquida de alta resolución.....	31
3.7.4.1.	Procedimiento	31
3.7.4.2.	Material y equipo.....	32
3.7.4.3.	Reactivos	32
3.7.5.	Determinación de la linealidad del método	32
3.7.5.1.	Procedimiento	32
3.7.5.2.	Material y equipo.....	33
3.7.5.3.	Reactivos	33
3.7.6.	Determinación de la exactitud del método	33
3.7.6.1.	Procedimiento	34

	3.7.6.2.	Material y equipo	34
	3.7.6.3.	Reactivos.....	35
	3.7.7.	Determinación de la precisión del método	35
	3.7.7.1.	Procedimiento	35
	3.7.7.2.	Material y equipo	36
	3.7.7.3.	Reactivos.....	36
	3.7.8.	Determinación de la especificidad del método	36
	3.7.8.1.	Procedimiento	36
	3.7.8.2.	Material y equipo	37
	3.7.8.3.	Reactivos.....	37
	3.7.9.	Determinación de los límites de cuantificación y detección	37
	3.7.10.	Determinación de la robustez del método	38
	3.7.10.1.	Procedimiento	38
	3.7.10.2.	Material y equipo	38
	3.7.10.3.	Reactivos.....	39
	3.7.11.	Análisis de muestras por volumetría	39
	3.7.11.1.	Procedimiento	39
	3.7.11.2.	Material y equipo	40
	3.7.11.3.	Reactivos.....	40
	3.7.12.	Tabulación de resultados	41
	3.8.	Análisis estadístico.....	49
4.	RESULTADOS.....		51
	4.1.	Calibración de equipo	51
	4.2.	Linealidad.....	56
	4.3.	Exactitud	66
	4.4.	Precisión	72
	4.6.	Límites de cuantificación y detección.....	79

4.7.	Análisis de muestras.....	84
4.8.	Especificidad.....	97
5.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	103
	CONCLUSIONES.....	109
	RECOMENDACIONES.....	111
	BIBLIOGRAFÍA.....	113
	APÉNDICES.....	115
	ANEXO.....	119

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

1.	Diseño general de la técnica cuantitativa.....	26
2.	Cromatograma de la corrida 1 del estándar E1	52
3.	Cromatograma de la corrida 2 del estándar E1	52
4.	Cromatograma de la corrida 3 del estándar E1	53
5.	Cromatograma de la corrida 1 del estándar E2	53
6.	Cromatograma de la corrida 2 del estándar E2	54
7.	Cromatograma de la corrida 3 del estándar E2	54
8.	Cromatograma de la corrida 1 del estándar E3	55
9.	Cromatograma de la corrida 2 del estándar E3	55
10.	Cromatograma de la corrida 3 del estándar E3	56
11.	Cromatograma de la corrida 1 del estándar al 60%.....	58
12.	Cromatograma de la corrida 2 del estándar al 60%.....	58
13.	Cromatograma de la corrida 3 del estándar al 60%.....	59
14.	Cromatograma de la corrida 1 del estándar al 65%.....	59
15.	Cromatograma de la corrida 2 del estándar al 65%.....	60
16.	Cromatograma de la corrida 3 del estándar al 65%.....	60
17.	Cromatograma de la corrida 1 del estándar al 70%.....	61
18.	Cromatograma de la corrida 2 del estándar al 70%.....	61
19.	Cromatograma de la corrida 3 del estándar al 70%.....	62
20.	Cromatograma de la corrida 1 del estándar al 75%.....	62
21.	Cromatograma de la corrida 2 del estándar al 75%.....	63
22.	Cromatograma de la corrida 3 del estándar al 75%.....	63
23.	Cromatograma de la corrida 1 del estándar al 80%.....	64

24.	Cromatograma de la corrida 2 del estándar al 80%.....	64
25.	Cromatograma de la corrida 3 del estándar al 80%.....	65
26.	Linealidad del método.....	65
27.	Cromatograma de la corrida 1 de la muestra 1	67
28.	Cromatograma de la corrida 2 de la muestra 1	67
29.	Cromatograma de la corrida 3 de la muestra 1	68
30.	Cromatograma de la corrida 4 de la muestra 1	68
31.	Cromatograma de la corrida 5 de la muestra 1	69
32.	Cromatograma de la corrida 6 de la muestra 1	69
33.	Cromatograma de la corrida 7 de la muestra 1	70
34.	Cromatograma de la corrida 8 de la muestra 1	70
35.	Cromatograma de la corrida 9 de la muestra 1	71
36.	Cromatograma de la corrida 10 de la muestra 1.....	71
37.	Cromatograma de la corrida 1 del estándar E2	74
38.	Cromatograma de la corrida 2 del estándar E2	74
39.	Cromatograma de la corrida 3 del estándar E2	75
40.	Cromatograma de la corrida 4 del estándar E2	75
41.	Cromatograma de la corrida 5 del estándar E2	76
42.	Cromatograma de la corrida 6 del estándar E2	76
43.	Cromatograma de la corrida 7 del estándar E2	77
44.	Cromatograma de la corrida 8 del estándar E2	77
45.	Cromatograma de la corrida 9 del estándar E2	78
46.	Cromatograma de la corrida 10 del estándar E2	78
47.	Cromatograma de la corrida 1 de la muestra a 1 000 ppm.....	80
48.	Cromatograma de la corrida 2 de la muestra a 1 000 ppm.....	80
49.	Cromatograma de la corrida 3 de la muestra a 1 000 ppm.....	81
50.	Cromatograma de la corrida 1 de la muestra a 10 ppm.....	81
51.	Cromatograma de la corrida 2 de la muestra a 10 ppm.....	82
52.	Cromatograma de la corrida 3 de la muestra a 10 ppm.....	82

53.	Cromatograma de la corrida 1 de la muestra a 1 ppm.....	83
54.	Cromatograma de la corrida 2 de la muestra a 1 ppm.....	83
55.	Cromatograma de la corrida 3 de la muestra a 1 ppm.....	84
56.	Cromatograma de la muestra A del Lote 1	87
57.	Cromatograma de la muestra B del Lote 1	87
58.	Cromatograma de la muestra C del Lote 1	88
59.	Cromatograma de la muestra D del Lote 1	88
60.	Cromatograma de la muestra E del Lote 1	89
61.	Cromatograma de la muestra A del Lote 2	89
62.	Cromatograma de la muestra B del Lote 2	90
63.	Cromatograma de la muestra C del Lote 2	90
64.	Cromatograma de la muestra D del Lote 2	91
65.	Cromatograma de la muestra E del Lote 2	91
66.	Cromatograma de la muestra A del Lote 3	92
67.	Cromatograma de la muestra B del Lote 3	92
68.	Cromatograma de la muestra C del Lote 3	93
69.	Cromatograma de la muestra D del Lote 3	93
70.	Cromatograma de la muestra E del Lote 3	94
71.	Cromatograma de la muestra A del Lote 4	94
72.	Cromatograma de la muestra B del Lote 4	95
73.	Cromatograma de la muestra C del Lote 4	95
74.	Cromatograma de la muestra D del Lote 4	96
75.	Cromatograma de la muestra E del Lote 4	96
76.	Cromatograma del Caolín	97
77.	Cromatograma de la fase de extracción	98

TABLAS

- I. Definición operacional de las variables para la validación de un

	método analítico por cromatografía líquida de alta resolución.....	23
II.	Resultados de la calibración del equipo	41
III.	Resultados de los ensayos para determinación de la linealidad del método.....	42
IV.	Resultados de los ensayos para determinación de la exactitud del método.....	43
V.	Resultados de los ensayos para determinación de la precisión del método.....	44
VI.	Límites de cuantificación y detección	44
VII.	Comparación entre los resultados de análisis cromatográfico y volumétrico del porcentaje de Propineb en las muestras.....	45
VIII.	Comparación entre resultados de análisis cromatográfico y volumétrico de las muestras de Propineb (tiempo de respuesta y desechos).	46
IX.	Comparación de costos para ambos métodos analíticos	47
X.	Resultados de los parámetros de la validación	47
XI.	Porcentajes de reducción entre ambos métodos	48
XII.	Eficiencia de los métodos analíticos.....	48
XIII.	Resultados de calibración del equipo.....	51
XIV.	Resultados de los ensayos para determinación de la linealidad del método.....	57
XV.	Resultados de los ensayos para determinación de la exactitud del método.....	66
XVI.	Resultados de las pruebas estadísticas para exactitud	72
XVII.	Resultados de los ensayos para la determinación de la precisión del método.....	73
XVIII.	Resultados de las pruebas estadísticas para precisión	79
XIX.	Límites de cuantificación y detección.....	79
XX.	Comparación entre resultados de análisis cromatográfico	

	y volumétrico del porcentaje de Propineb en las muestras	85
XXI.	Resultados de análisis de varianzas (ANOVA) para muestras	86
XXII.	Resultados de los parámetros de la validación	86
XXIII.	Comparación entre resultados de análisis cromatográfico y volumétrico de las muestras de Propineb (tiempo de respuesta y desechos).....	99
XXIV.	Comparación de costos para ambos métodos analíticos.....	100
XXV.	Porcentajes de reducción entre ambos métodos	100
XXVI.	Eficiencia de los métodos analíticos	101

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
R'	Coeficiente de correlación
CV	Coeficiente de variación
C	Cromatografía
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
D	Desechos
S	Desviación estándar
D'	Diferencia
Ef	Eficiencia
Er	Error
E	Estándar
°C	Grados Centígrados o Celsius

GL	Grados de Libertad
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
L	Litro
X	Media
mL	Mililitros
min	Minutos
nm	Nanómetros
ppm	Partes por millón
%	Porcentaje
Q	Quetzal
R	Resultado
t	Tiempo de respuesta
T	Total
V	Volumetría

GLOSARIO

Calibración	Conjunto de operaciones que establecen, bajo condiciones especificadas, la relación entre los valores de magnitudes indicados por un instrumento o sistema de medición o valores representados por una medida materializada o un material de referencia y los correspondientes valores aportados por patrones.
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	Técnica de análisis basadas en la separación de componentes de una mezcla y su posterior detección.
Cromatógrafo	Equipo que permite una separación sofisticada.
Cromatograma	Resultado gráfico de la cromatografía. En el caso de separación óptima, los diferentes picos o manchas del cromatograma se corresponden a los componentes de la mezcla separada.
Especificidad	Habilidad de determinar sin ninguna equivocación, al analito, en presencia de otros componentes que se espera estén presentes.

Estándar	Preparación que contiene una concentración conocida de un elemento específico o sustancia.
Exactitud	Cercanía de los resultados obtenidos por el método al valor real.
Fase de extracción	Puede ser un sólido o un líquido que se queda fijo en la misma posición.
Fase móvil	Puede ser un líquido o un gas que corre a través de una superficie y de la fase estacionaria.
Límite de cuantificación	Es la cantidad más baja de analito que puede ser determinada con precisión aceptable (10:1).
Límite de detección	Es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada (2:1 o 3:1).
Linealidad	Habilidad para producir resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en muestras dentro de un rango dado.
Mejora continua	Actividad recurrente para aumentar la capacidad para cumplir los requisitos.
Muestra	Conjunto de casos de una población estadística.

Precisión	Grado de congruencia entre resultados de pruebas individuales cuando el método es aplicado repetidamente a muestreos múltiples de una muestra homogénea.
Propineb	Fungicida preventivo y curativo de amplio espectro de acción.
Repetibilidad	Variación de las mediciones obtenidas con un instrumento de medición cuando es utilizado varias veces por un evaluador, cuando mide la misma característica en la misma parte.
Reproducibilidad	Grado de congruencia de los resultados obtenidos del análisis de las mismas muestras bajo una variedad de condiciones (diferentes laboratorios, diferentes lotes de reactivos, diferentes temperaturas de ensayo, diferentes analistas, diferentes días, etcétera).
Robustez	Medida de la capacidad para no ser afectado por pequeñas, pero deliberadas variaciones en los parámetros del método, lo cual provee una indicación de su veracidad durante el uso cotidiano.

Sistema de Gestión de Calidad (SGC)

Parte del sistema de gestión enfocada en el logro de resultados, en relación con los objetivos de la calidad, para satisfacer las necesidades, expectativas y requisitos de las partes interesadas, según corresponda.

Tiempo de respuesta

Tiempo que transcurre desde que se recibe la muestra en el laboratorio hasta que se emite el informe de resultados.

Tiempo de retención

Tiempo que transcurre después de la inyección de la muestra para que el pico del analito alcance el detector.

Validación

Confirmación por examinación y provisión de evidencia objetiva que los requerimientos particulares para un uso específico se cumplen.

RESUMEN

La empresa multinacional de agroquímicos tiene implementado un sistema integrado de gestión de calidad, ambiente, seguridad y salud ocupacional, actualmente se están trabajando proyectos de investigación, por lo que se encuentra obligada a mejorar continuamente por medio del desarrollo de nuevos métodos y la implementación de los mismos, para mantener las demandas de calidad solicitadas por el mercado. Al desarrollar los nuevos métodos de análisis la empresa se ve exigida por el sistema de gestión de calidad a validar los mismos.

Con el presente trabajo de graduación se realizó la validación de un método para análisis de Propineb por cromatografía líquida de alta resolución para cumplir con las competencias técnicas del sistema de gestión de calidad. Para que el método fuera válido se realizaron las siguientes pruebas: exactitud, precisión, repetibilidad, reproducibilidad, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación y robustez utilizando estándares y muestras de Propineb.

Luego se evaluó el método utilizando cinco muestras de Propineb de cuatro lotes diferentes cada una, haciendo un total de veinte muestras. Dicha prueba cumplió con el parámetro de calidad de la empresa el cual estipula que el producto debe contener entre un 67,5% y 72,5% de Propineb en peso. Asimismo, para la validación se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,99561, determinando que el método es lineal dado que cumple con la estipulación de que el coeficiente de correlación debe estar entre 0,99 y 1.

Posteriormente, se evaluó la eficiencia en las buenas prácticas de laboratorio respecto al análisis de Propineb, usando como parámetro el tiempo de respuesta de análisis para cada muestra. Actualmente, este parámetro era de 22 minutos en promedio sólo para análisis de Propineb, se redujo a 12 minutos, es decir, en un 44% agilizando la liberación del producto y satisfaciendo la demanda del cliente.

OBJETIVOS

General

Validar un método para análisis de Propineb por cromatografía líquida de alta resolución, para el cumplimiento de las competencias técnicas en un sistema integrado de gestión de calidad, ambiente, salud y seguridad ocupacional.

Específicos

1. Realizar ensayos para validar el método de cromatografía líquida de alta resolución.
 - Determinar la exactitud, precisión, repetibilidad, reproducibilidad y especificidad del método por cromatografía líquida de alta resolución en un rango de 68% y 72% utilizando estándares de Propineb.
 - Determinar la linealidad del método con un coeficiente de correlación (R) entre 0,99 y 1, utilizando una gráfica de área *versus* concentración.
 - Determinar el límite de detección y el límite de cuantificación utilizando una gráfica de área *versus* concentración.

- Determinar la robustez del método por medio de un coeficiente de variación de una muestra y un estándar analizados durante varios días.
2. Aumentar la eficiencia en la liberación del producto, implementando el método analítico de cromatografía líquida de alta resolución previamente validado.
 3. Verificar los costos, cantidad de desechos y tiempo de respuesta del método cromatográfico y volumétrico, utilizando una tabla comparativa.

HIPÓTESIS

La validación de un método para análisis de un fungicida (Propineb) por cromatografía líquida de alta resolución, mejorará la eficiencia en las buenas prácticas de laboratorio y permitirá el seguimiento de la mejora continua en un sistema de gestión de calidad, ambiente, salud y seguridad ocupacional.

INTRODUCCIÓN

La gestión de calidad es un conjunto de métodos tanto productivos como analíticos para cumplir con las exigencias de calidad de un mercado en particular.

El laboratorio debe tener los recursos necesarios para cumplir con sus tareas, estos incluyen la implementación, el mantenimiento y la mejora continua del sistema de gestión, así como, ejecutar acciones para evitar la ocurrencia de las desviaciones en el sistema o en los procedimientos de ensayo.

La validación es uno de los puntos vitales para el cumplimiento de las normas en un sistema de gestión de calidad, esta consiste en establecer por medio de estudios de laboratorio una base de datos que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño, que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas.

Con el objetivo de realizar la validación de un método por cromatografía líquida de alta resolución se presentan los lineamientos, parámetros, conceptos y puntos de norma necesarios para cumplir con las exigencias establecidas por el sistema integrado de gestión de calidad.

1. ANTECEDENTES

Dentro de la Ingeniería Química y otras ramas afines a ésta se han realizado procedimientos y guías para validar procesos, así como la implementación de métodos de análisis que involucran cromatografía líquida de alta eficiencia; a continuación se presentan los más destacados:

En su trabajo de graduación realizado en 2003 por Ana Mary Rodríguez Mondal en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, de la Universidad de San Carlos de Guatemala, para la licenciatura en Química Biológica titulado: Implementación y validación de un método de cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta para la determinación de dos tetraciclinas en leche fresca de vaca, se requirieron patrones de oxitetraciclina y tetraciclina, los cuales se analizaron utilizando cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa y detector ultravioleta usando un método para el análisis de residuos de tetraciclinas en leche fresca de vaca.

Se determinaron las mejores condiciones cromatográficas para que las tetraciclinas eluyeran en tiempos de retención diferentes y se presentan picos definidos en el cromatograma. La mejor separación se logró con la siguiente proporción: 70% de solvente A, 22% de acetonitrilo y 8% de metanol a una temperatura de 20-25 °C.

Obtenidas las condiciones cromatográficas se procedió a determinar los parámetros para la validación del método, estos incluyen: precisión, exactitud, linealidad, sensibilidad, reproducibilidad, repetibilidad, robustez, límite de detección, límite de cuantificación, selectividad y especificidad.

Los parámetros de validación se obtuvieron preparando mezclas patrón de las dos tetraciclinas en estudio, cuyas concentraciones variaron entre 150 nanogramos por mililitro y 20 nanogramos por mililitro.

Se tomaron 5 muestras de leche con concentraciones de oxitetraciclina y tetraciclina que variaron entre 60 nanogramos por mililitro y 15 nanogramos por mililitro, las muestras se inyectaron por duplicado en el HPLC obteniéndose los picos correspondientes a cada tetraciclina.

Se indicó con base a los resultados que el método implementado es lineal porque sus coeficientes de correlación son cercanos a uno y con confiabilidad del 95%. También que es robusto porque acepta pequeños cambios a las condiciones del método y sensible porque los valores presentados de las pendientes son pequeños. De acuerdo con los resultados de esta investigación se concluyó que el método implementado es confiable para analizar la tetraciclina en la leche, pues se obtiene una separación adecuada y la mayoría de los parámetros de validación son aceptables.

En el informe de tesis realizado en 2004 por Marco Tulio Green Olmedo, estudiante de Ingeniería Química de la Facultad de Ingeniería, de la Universidad de San Carlos de Guatemala, que tiene por título Importancia de la validación del proceso de mezclado de triclosan en crema dental por medio de la determinación con cromatografía líquida de alta resolución, en el cual se determinó el porcentaje de triclosan en crema dental para 30 muestras tomadas al azar en diferentes turnos de producción durante quince días, utilizando como método de análisis la cromatografía líquida de alta resolución.

A los porcentajes de triclosan obtenidos de las muestras analizadas les fue aplicado un estudio estadístico, a partir del cálculo de dos índices basados en desviaciones estándar.

El primer indicador se basa en la variación que hay entre muestras, mientras que el segundo es la variación entre toda la población de datos. Luego ambos son comparados con los límites de especificación.

Los resultados presentan una confiabilidad de 99,74% y dado que la relación de los índices estadísticos fue mayor que 0,67 y menor que 1,33, el proceso de mezclado de triclosan pudo validarse. Se llegó a la conclusión que los procesos químicos dependen directamente de la validación de los mismos, pues con los índices es posible corregir y determinar las causas de las variaciones de los procesos.

En el informe de tesis realizado en 1993 por Claudia Regina Rodríguez Vargas, estudiante de Ingeniería Química de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, que tiene por título Procedimiento para la validación de métodos analíticos aplicado a cromatografía líquida de alta precisión, en el cual se procedió a una investigación a nivel laboratorio para determinar la selectividad, exactitud, precisión, linealidad y robustez de un método de cuantificación cromatográfico de activos en un producto farmacéutico, el cual contiene ácido ascórbico, bitartrato de fenilefrina, ácido acetilsalicílico y maleato de clorfeniramina.

La validación del procedimiento se realizó utilizando parámetros estadísticos como la desviación estándar, coeficientes de variación y regresiones lineales. Se obtuvieron variaciones de los tiempos de retención menores del 10% y se pudo comprobar que los datos obtenidos del método son confiables.

Con estos resultados y el cumplimiento de los parámetros de validación se demostró que el método en estudio es confiable para su uso rutinario dentro del laboratorio. Asimismo, el método es confiable para determinar si un producto puede ser liberado para distribuirse en el mercado, asegurando la calidad del producto de acuerdo con los estándares requeridos.

En el informe de tesis realizado en 1998 por Sandra Patricia De León de Barrientos De Barco, estudiante de Química Farmacéutica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, de la Universidad de San Carlos de Guatemala, que tiene por título Validación del método de cromatografía líquida de alta resolución para cuantificación de vitamina A en tabletas multivitamínicas masticables, en el cual se determinó que el método de HPLC propuesto para cuantificar vitamina A en tabletas multivitamínicas masticables, cumple con los parámetros de selectividad, exactitud, precisión del método y del sistema, linealidad y reproducibilidad para ser considerado un método válido para dicha cuantificación.

Se seleccionaron muestras de forma aleatoria y fueron preparados para la evaluación de los parámetros mencionados anteriormente. Obtenidos los resultados se procedió a la evaluación estadística de estos, permitiendo así concluir que el método propuesto cumple con las características necesarias para ser implementado, garantizando que los resultados obtenidos son confiables.

2. MARCO TEÓRICO

La gestión de calidad es un conjunto de métodos tanto productivos como analíticos para cumplir con las exigencias de calidad de un mercado en particular. El Dr. Ishikawa define la gestión de calidad de la siguiente manera: “Practicar la gestión de calidad es desarrollar, diseñar, manufacturar y mantener un producto de calidad que sea el más económico, el más útil y siempre satisfactorio para el consumidor”.¹

Una empresa que tenga implementado un sistema integrado de gestión de calidad debe promover la mejora continua dentro de su sistema para cumplir con los parámetros de calidad del mercado. Para ello, se validan e implementan nuevos métodos dentro de los laboratorios encargados de la liberación de producto.

Para la liberación del producto y la mejora continua, el laboratorio debe tener los recursos necesarios para cumplir con sus tareas, estos incluyen la implementación, el mantenimiento y la mejora continua del sistema de gestión, así como ejecutar acciones para evitar la ocurrencia de las desviaciones en el sistema o en los procedimientos de ensayo.

¹ ISHIKAWA, Kaoru. *¿Qué es el control de calidad? La modalidad japonesa*. p. 40.

2.1. Validación

Es la confirmación que se da por la recopilación y análisis de la evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para el uso específico propuesto.

La validación de un procedimiento analítico debe establecerse por medio de estudios de laboratorio, una base de datos que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Implica la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y del error sistemático y al azar de un procedimiento, no sólo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales.

Según la Norma COGUANOR NGR/ISO/IEC 17025 en su punto 5.4.5 Validación de los métodos en el primer inciso de dicho punto establece: “La validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto”. Asimismo, en el inciso 5.4.5.2 menciona lo siguiente:

“El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla. La validación debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de aplicación dados. El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto”.

La determinación del desempeño del método para su validación puede hacerse por varias técnicas y la combinación de estas, las cuales incluyen:

- Calibración utilizando estándares del producto que se va analizar por el método propuesto.
- Comparación entre los resultados del método propuesto con los obtenidos por medio de otros métodos.
- Comparación con otros laboratorios.
- Evaluación de la incertidumbre de los resultados basándose en los principios teóricos del método y en la experiencia práctica.

Cabe mencionar que la validación es un equilibrio entre costos, riesgos y posibilidades técnicas, es decir, el laboratorio implementará métodos que estén al alcance de sus equipos, capacidades de sus analistas y de su gerencia.

La Norma ISO 9001 en el punto 7.3.6 Validación, establece que debe: "...asegurarse que el producto/servicio resultante es capaz de cumplir con los requisitos para su aplicación específica o uso intencionado... La validación debe completarse antes de la entrega o implementación del producto/servicio, cuando sea práctico".

Asimismo, establece en su punto 7.6 Control de los equipos de seguimiento y medición, que los equipos deben calibrarse (utilización de estándares) y confirmar su habilidad en monitoreo y medición para satisfacer los parámetros de calidad estipulados por la empresa.

2.1.1. ¿Por qué validar?

Virtualmente, casi todos los aspectos en la sociedad están fundamentados en mediciones analíticas. La validación no sólo es cumplir con un punto de norma, sino que implica la confirmación para determinar si un producto puede salir al mercado o no, dado que si un método es válido los resultados de análisis obtenidos son más precisos, exactos, seguros, confiables. Asimismo, asegura a la producción que el proceso se está llevando a cabo de la manera correcta.

Los requerimientos para la validación son los siguientes:

- Instrumentos calificados y calibrados
- Métodos documentados
- Estándares de referencia confiables
- Analistas calificados
- Integridad de la muestra

2.1.2. Ensayos para la validación de un método analítico

Para validar un método requiere la determinación de los siguientes ensayos:

- Exactitud
- Precisión
- Especificidad
- Límite de detección
- Límite de cuantificación

- Linealidad y rango
- Reproducibilidad
- Robustez

La exactitud de un método analítico es la cercanía de los resultados obtenidos por el método al valor real. La determinación de la exactitud se lleva a cabo utilizando un patrón de pureza conocida o comparando los resultados del método con aquellos de otro bien caracterizado, cuya exactitud esté definida o, añadiendo cantidades del analito a una mezcla sintética del producto.

La precisión es el grado de congruencia entre resultados de pruebas individuales, cuando el método es aplicado repetidamente a muestreos múltiples de una muestra homogénea. Se puede medir por el grado de reproducibilidad o repetibilidad del método analítico. Para determinar la precisión de un método es necesario ensayar un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea.

Reproducibilidad es el grado de congruencia de los resultados obtenidos del análisis de las mismas muestras bajo una variedad de condiciones (diferentes laboratorios, diferentes lotes de reactivos, diferentes temperaturas de ensayo, diferentes analistas, diferentes días, etcétera).

Especificidad es la habilidad de determinar sin ninguna equivocación, al analito, en presencia de otros componentes que se espera estén presentes, tales como impurezas, productos de degradación y componentes.

El límite de detección es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada (2:1 ó 3:1). Para determinar el límite de detección se realiza un análisis de muestras con concentraciones conocidas del analito, para establecer el mínimo nivel al cual este puede ser verazmente detectado.

El límite de cuantificación es característico de los ensayos cuantitativos para compuestos de bajos niveles en matrices de muestras, tales como impurezas y productos de degradación. Es la cantidad más baja de analito que puede ser determinada con precisión aceptable (10:1).

Linealidad es la habilidad para producir resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en muestras dentro de un rango dado.

Rango es el intervalo entre los niveles inferior y superior del analito, que han demostrado pueden ser determinados con un apropiado nivel de precisión.

Robustez es la medida de la capacidad para no ser afectado por pequeñas, pero deliberadas variaciones en los parámetros del método, lo cual provee una indicación de su veracidad durante el uso cotidiano. Este parámetro se puede determinar de dos maneras:

- Variando uno a uno los factores que se consideran sospechosos (estudio incompleto).
- Realizando variaciones sistemáticas para determinar cómo varía el resultado del ensayo (estudio completo).

2.2. Breve introducción a la cromatografía

La cromatografía es un método muy utilizado en todas las ramas de la ciencia y que permite la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas. Ningún otro método de separación es tan potente y de aplicación tan general como la cromatografía.

Es difícil definir rigurosamente el término de cromatografía, ya que se ha aplicado ese nombre a varios sistemas y técnicas. Sin embargo, todos esos métodos tienen en común el uso de una fase estacionaria y una fase móvil.

En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa o cuantitativamente.

2.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

HPLC (high performance liquid chromatography) o cromatografía líquida de alta resolución, es una técnica cromatográfica usada para separar componentes usando una variedad de interacciones químicas entre el analito y la columna cromatográfica.

Básicamente es un sistema compuesto de un reservorio de fase móvil, bomba, inyector, columna de separación y detector. El analito se pasa a través de una columna de la fase estacionaria bombeando la fase móvil líquida con alta presión. La muestra se introduce en pequeños volúmenes a la corriente de la fase móvil y allí se retarda por medio de interacciones químicas con la fase estacionaria mientras atraviesa la columna.

El retardo se conoce como tiempo de retención, único por analito. Depende de la naturaleza del analito, de la fase estacionaria y de la composición de la fase móvil.

Los solutos más comunes usados en la fase móvil son combinaciones de agua purificada con líquidos orgánicos, los más comunes son Metanol y Acetonitrilo, también suelen usarse sales y bufferes para contribuir a la separación de componentes. También se usa el Ácido Trifluoroacético para actuar como formador de pares iónicos.

Estas combinaciones introducen el concepto de gradiente de elución. Consiste en la variación de la composición de la fase móvil, para adaptarse a los diferentes analitos y conseguir mejores resultados. El gradiente separa la matriz del analito en función de la afinidad del analito por la composición de la fase móvil. Cada analito tiene un gradiente de elución óptimo para obtener la máxima separación de picos en el detector. Existen varios tipos de HPLC.

2.3.1. Cromatografía de fase normal

Fue el primer tipo de HPLC, que separaba analitos basándose en la polaridad. Este método usa una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar que se usa cuando el analito es polar. El analito polar es retenido por la fase estacionaria polar. La adsorción aumenta con la polaridad del analito y la interacción entre analito y fase estacionaria. Esto incrementa el tiempo de elución. La fuerza de interacción depende no sólo de los grupos funcionales, sino también de factores estéricos e isómeros estructurales.

El uso de disolventes polares disminuye el tiempo de retención, mientras que disolventes hidrófobos aumentan el tiempo de retención. Algunos solutos polares interactúan con la fase estacionaria y desactivan la columna.

2.3.2. Cromatografía de fase inversa

Este tipo de HPLC es el más común. En esta técnica se usa una fase estacionaria no polar y una fase móvil moderadamente polar. La fase estacionaria típica es silicio tratado con RMe_2SiCl , donde R es una cadena lineal con un grupo alcalino.

La adición de disolventes polares incrementa el tiempo de retención y añadir disolventes hidrofóbicos lo disminuyen. El tiempo de retención es mayor para moléculas no polares. El principio básico de este método está basado en las interacciones del disolvente polar, el analito no polar y la fase estacionaria no polar.

Las características del analito son importantes para sus propiedades de retención. Las moléculas muy grandes pueden causar que la interacción no sea completa. El tiempo de retención aumenta con el área hidrofobicidad, que es inversamente proporcional al tamaño del soluto. Los componentes ramificados eluyen más rápido porque el área total esta disminuida. Hay otros modificadores de la fase móvil que afectan a la retención del analito. Añadir sales inorgánicas causa incremento lineal en la tensión superficial de soluciones acuosas, incrementando el tiempo de retención.

El pH también es importante porque modifica la hidrofobia del analito. Por eso se suele usar un buffer como fosfato sódico para controlar el pH. Un ácido orgánico como ácido fórmico o ácido trifluoracético. Sirven para muchas cosas, controlan el pH, neutralizan cualquier carga residual del silicato en la fase estacionaria y actúa como formador de pares iónicos para neutralizar la carga del analito. Los efectos varían pero aumentan la calidad de la cromatografía.

Las columnas de fase inversa son más difíciles de dañar que las normales. Algunas consisten en silicatos alcalinos y nunca se deben usar con sales acuosas, destruirían el silicato. Pueden ser usados con ácidos acuosos, pero no durante mucho tiempo, pueden corroer metal. El metal debe estar en bajo contenido para que la separación de sustancias sea mejor.

2.3.3. Cromatografía de exclusión por tamaño

También conocida como cromatografía de gel permeante o cromatografía de gel filtrante. Separa las partículas en función del tamaño. Es una cromatografía de baja resolución y sirve para determinar estructuras terciarias y cuaternarias de proteínas y es la técnica común para averiguar el peso molecular de polímeros sintéticos y naturales.

2.3.4. Cromatografía de intercambio iónico

La retención está basada en la atracción entre iones del soluto y la carga complementaria de la fase estacionaria. Si los iones del soluto y la fase estacionaria tienen la misma carga, son excluidos. Algunos intercambiadores de iones son:

- Resinas de Poliestireno: permite entrecruzamientos que dan estabilidad a la cadena.
- Celulosa: tiene tamaño de poros más grandes y bajas densidades de carga que los hacen ideales para la separación de proteínas.
- Poro controlado de vidrio o silicona porosa.

Los intercambiadores de iones favorecen la unión de iones de mayor carga y radio inferior. Un incremento en el contra-ión (con respecto a los grupos funcionales de resinas) reduce el tiempo de retención. Un incremento del pH reduce el tiempo de retención en el intercambio catiónico, pero bajar el pH reduce la retención en intercambio aniónico.

Se usa en la purificación de agua, preconcentración de componentes traza, cromatografía de intercambio de ligandos, cromatografía de intercambio de iones de proteínas, intercambio de aniones a alto pH de carbohidratos y polisacáridos.

2.3.5. Cromatografía de bioafinidad

Se basa en las propiedades de sustancias bioactivas para formar complejos estables, específicos y reversibles. La formación de los complejos implica fuerzas moleculares como Van der Waals, electrostática, dipolo-dipolo, hidrofóbicas y puentes de hidrógeno. Una unión bioespecífica se forma por acción simultánea de estas fuerzas en los sitios de unión.

2.3.6. Características HPLC

- Columnas reutilizables de diámetro reducido (2-5 mm).
- El empaque de las columnas está constituido por partículas muy pequeñas (3, 5, 10, 20 μm).
- Flujos de fase móvil controlados y a presiones altas.
- Introducción precisa de muestras al sistema, sin necesidad de volúmenes grandes.
- Detectores continuos capaces de detectar cantidades muy reducidas de muestra.

- Análisis rápidos
- Alta resolución

2.4. Propineb

Es un fungicida preventivo y curativo de amplio espectro de acción. Controla eficazmente: alternaria, rancha, roya, cercospora y botritis en hortalizas, espárrago, frutales, algodón, ají, vid y cítricos. En cítricos controla el ácaro del tostado.

En arroz se utiliza como desinfectante de semillas. Contiene zinc que es tomado fácilmente por la planta (efecto tonificante en la planta) y ayuda a corregir deficiencias de este elemento.

Es un fungicida protectante de acción multisitio. Inhibe la germinación de esporas y con ello evita el desarrollo del hongo. Puede mezclarse con otros productos fitosanitarios de uso común.

Recomendaciones de uso para Guatemala: tomate, papa, chile, berenjena, frijol, melón, cebolla, ajo, café, arroz, tabaco, manzana, banano, sandía, pepino, calabaza y ornamentales.

2.4.1. Información especializada

Se presenta un listado de enfermedades que son controladas por el Propineb en los respectivos cultivos:

- Algodonero, ají, haba: mancha negra de la hoja (*Alternaria tenuis*) Cercosporiasis (*Cercospora capsici*) Mancha de la hoja (*Cercospora fabae*) papa, tomate: hiel fungoso (*Phytophthora infestans*).
- Sandía, melón, zapallo: mildiu (*Pseudoperonospora cubensis*).
- Melón: mancha de la hoja (*Alternaria spp*).
- Naranja, vid, fresa: podredumbre gris de las flores (*Botrytis cinerea*).
- Espárrago: roya (*Puccinia asparagi*).
- Arroz: manchado de la semilla (*Trichoconis padwickii*). Manchado de la hoja (*Curvularia sp.*). Manchado de la semilla (*Alternaria sp.*). Mancha carmelita (*Helminthosporium oryzae*). Manchado de la semilla.
- Podredumbre del tallo (*Fusarium sp*).

Si por su mal empleo, negligencia o causa fortuita se produjeran síntomas de intoxicación por ingestión (náuseas, vómitos, diarreas, también puede producirse lipotimia), acudir de inmediato al médico. Entretanto provocar el vómito dándole de beber un vaso de agua tibia con una cucharita de sal o por medios mecánicos, haciendo un lavado gástrico; finalmente administrar un purgante salino.

Por aspiración y contacto, se observan casos de rinitis, faringitis, bronquitis, dermatitis y conjuntivitis. En caso de intoxicación por contacto, lavar la piel y conjuntivas con abundante agua. Si la intoxicación es por aspiración, son eficaces las inhalaciones de manzanilla. Si se produce dermatitis, usar pomadas con antibióticos para evitar posibles infecciones y para la conjuntivitis, ungüentos oftálmicos. Contraindicaciones: alcohol, grasas y aceite.

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Variables

Como resultado de la revisión bibliográfica sobre los factores que influyen en la validación de métodos, se establecieron las variables de entrada para determinar el efecto de los resultados en los ensayos.

Tabla I. **Definición operacional de las variables para la validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución**

Variable	Independiente	Dependiente	Controlable	Respuesta
Porcentaje de Propineb en la muestra	X		X	X
Tiempo de respuesta de análisis		X	X	X

Fuente: elaboración propia.

3.2. Delimitación del campo de estudio

- Campo: agroquímicos
- Área: fungicidas

- Línea: gestión total de la calidad, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- Proyecto: validación de un método por cromatografía líquida de alta resolución para el cumplimiento de un sistema integrado de gestión de calidad.
- Ubicación: planta Bayer CropScience, km 29,5 Carretera al Pacífico, Amatitlán.

3.3. Recursos humanos disponibles

- Investigador: José Estuardo Lira Sosa
- Asesor: Ing. Héctor Federico Fuentes
- Co – asesor: Ing. José Estuardo Sazo.
- Colaboradores: Juan López Rosales, Oliver Rivera y William De Paz.

3.4. Recursos materiales disponibles

Se utilizaron estándares de Propineb proporcionados por el laboratorio para evaluar el método de cromatografía líquida de alta resolución. Posteriormente se analizaron muestras de Propineb, provenientes del área de producción de la planta, utilizando el método propuesto para validarlo.

3.4.1. Reactivos y muestras

- Estándares de Propineb
- Muestras de Propineb de diferentes lotes

- Acetonitrilo
- Tolueno
- Alcohol isopropílico (IPA)
- EDTA
- Tetrahidrofurano
- Hidróxido de amonio
- Agua desmineralizada
- Tabletas buffer

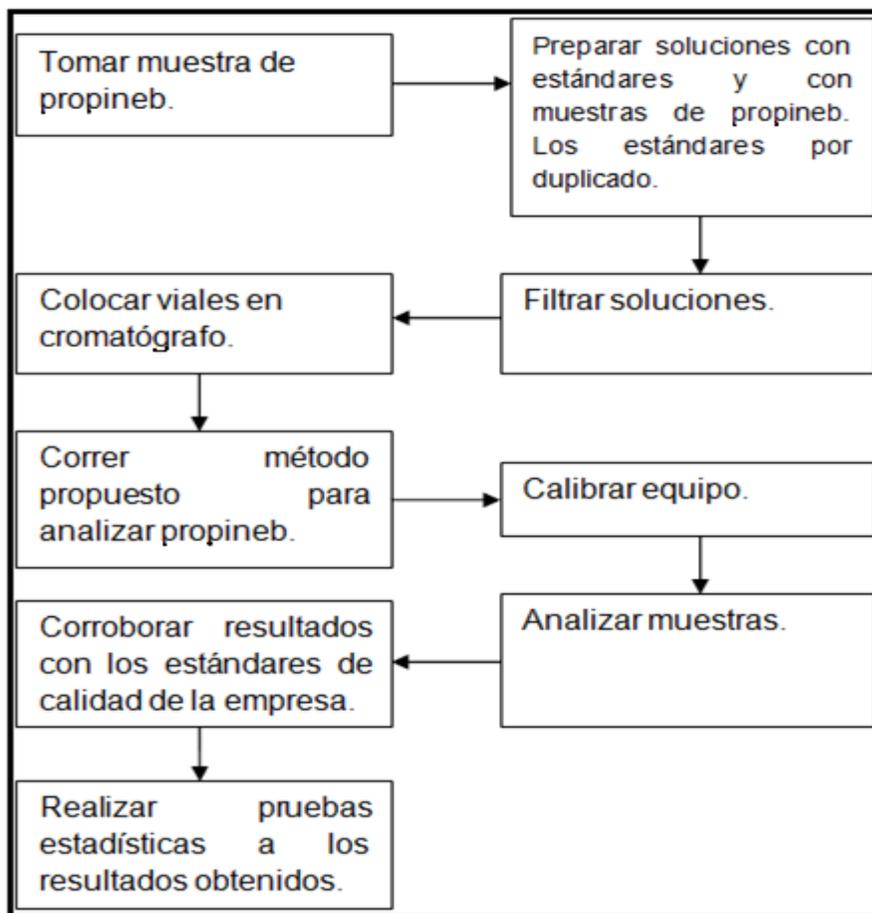
3.4.2. Equipo y cristalería

- 1 cromatógrafo líquido de alta resolución marca Agilent Technologies
- 1 200 series
- 1 columna Superspher 100 RP 18
- 1 computadora marca HP Compaq para programación del método cromatográfico.
- 20 viales
- 20 tapones para viales
- 20 frascos de 25 mililitros para preparación de soluciones de Propineb
- 5 jeringas
- 5 filtros para solución
- 5 earlenmeyers de 100 mililitros
- 1 pipeta volumétrica de 1 mililitro
- 1 bureta de 25 mL
- Perilla de succión

3.5. Técnica cuantitativa

Se utilizó una técnica cuantitativa para buscar las causas del fenómeno a través de hipótesis. Se presenta a continuación el procedimiento general para análisis de Propineb en muestras.

Figura 1. Diseño general de la técnica cuantitativa



Fuente: elaboración propia.

3.6. Recolección y ordenamiento de la información

Toda empresa que se encuentre acreditada o que esté en proceso de acreditarse respecto a algún sistema internacional de normas de gestión de calidad debe validar los métodos de análisis para asegurar la confiabilidad del proceso y del sistema de gestión. Asimismo, deben validarse para evitar una no conformidad con el sistema y con la norma en la cual se está acreditada.

Si no hay validación no se pueden implementar nuevos métodos y por lo tanto no habrá una mejora continua en el sistema integrado de gestión de calidad.

Se validó un método por cromatografía líquida de alta resolución utilizando estándares de Propineb y luego con muestras de diferentes lotes cada una. Preparadas las soluciones previamente y con las condiciones del método ya estipuladas se evaluaron los siguientes parámetros: exactitud, precisión, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, reproducibilidad, repetibilidad y especificidad.

Realizada la validación se procedió a una comparación entre el método cromatográfico y el método volumétrico, con esto se pudo concluir que el primero es más eficiente que el segundo porque es más exacto, preciso, se emplea menor cantidad de reactivos y por lo tanto reduce desechos y costos.

Para lo anteriormente dicho se tomaron en cuenta algunos aspectos, tales como el solvente a utilizar para preparar las soluciones, el tipo de columna para ejecutar el método, la fase móvil en el cromatógrafo y sobre todo que los resultados obtenidos del análisis cumplieron con los parámetros de calidad de la empresa.

Esto último se comprobó con los cromatogramas obtenidos por el programa utilizado para cuantificar Propineb en las muestras (véase el apartado 4.7 Análisis de muestras de la sección de resultados).

Cabe mencionar también que se utilizaron programas estadísticos, utilizados por la empresa, como soporte para corroborar los parámetros necesarios para la validación del método mencionados anteriormente.

3.7. Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información

Se presentan los procedimientos que se realizaron para la obtención de los resultados, el formato de tabulación para la organización de los mismos y las relaciones entre las variables para dar respuesta al problema.

3.7.1. Determinación de las condiciones del método propuesto

Con la validación se determinó que el método propuesto por cromatografía líquida de alta resolución cumple con los requisitos estipulados por el sistema de gestión de calidad, ambiente, salud y seguridad ocupacional en el que se encuentra acreditada la empresa.

Las condiciones del método propuesto fueron las siguientes:

- Flujo 1,5 mililitros por minuto
- Longitud de onda: 245 nanómetros
- Volumen de inyección 10 microlitros
- Temperatura 40 °C
- Columna Superspher 100

3.7.2. Preparación de soluciones

Se prepararon soluciones tanto con estándares como con muestras de Propineb utilizando diferentes solventes, como la fase ACE:THF:IPA, 2:3:5, tolueno, agua, acetona y ácido fosfórico (0.03 M):MeOH, 25:75.

3.7.3. Calibración de equipo

Para esta parte se calibró el equipo con estándares analíticos de Propineb utilizando el método propuesto con las condiciones de análisis establecidas y descritas anteriormente.

3.7.3.1. Procedimiento

- Filtrar las soluciones de estándares de Propineb y colocarlas en los viales.
- Colocar viales en cromatógrafo
- Hacer correr el método propuesto para analizar Propineb

- La pantalla de la computadora presentará el cromatograma que se generó a partir del análisis. Abrir el reporte generado a partir del análisis, este mostrará los resultados de la cantidad de Propineb en la muestra.
- Promediar los resultados de los estándares y este no debe tener más de 3% de diferencia entre sí. El valor más cercano al promedio será el estándar para calibrar el equipo.
- Ir a la tabla de calibración del programa y corregir los pesos para preparar el estándar.
- Corregir los tiempos de retención de la muestra. Aparecerá una línea azul, la cual deberá estar alineada con el pico del cromatograma.
- Seleccionar el menú para calibrar el equipo. Abrir el reporte y en el final deberá aparecer un 100,0000%.

3.7.3.2. Material y equipo

- Cromatógrafo líquido de alta resolución
- Computadora para programación del método de análisis
- Viales para almacenamiento y análisis de muestra
- Jeringas
- Filtros

3.7.3.3. Reactivos

- Solventes
- Estándares de Propineb

3.7.4. Análisis de muestras por cromatografía líquida de alta resolución

El análisis de muestras confirmó que las condiciones de análisis para el Propineb eran las ideales. Se procedió de manera similar al análisis de los estándares y se describe a continuación.

3.7.4.1. Procedimiento

- Filtrar las soluciones de muestras de Propineb y colocarlas en los viales.
- Colocar viales en cromatógrafo
- Hacer correr el método propuesto para analizar Propineb.
- La pantalla de la computadora presentará el cromatograma que se generó a partir del análisis. Abrir el reporte generado a partir del análisis, este mostrarán los resultados de la cantidad de Propineb en la muestra.
- Verificar que los datos en la tabla al final del reporte correspondan a los límites establecidos en el producto. Si todo concuerda el producto puede ser liberado.

3.7.4.2. Material y equipo

- Cromatógrafo líquido de alta resolución
- Computadora para programación del método de análisis
- Viales para almacenamiento y análisis de muestra
- Jeringas
- Filtros

3.7.4.3. Reactivos

- Solventes
- Estándares de Propineb

3.7.5. Determinación de la linealidad del método

La linealidad del método se determinó por medio del uso de estándares de Propineb a distinta concentración cada uno, según como se describe a continuación:

3.7.5.1. Procedimiento

- Preparar soluciones con estándares de Propineb a las siguientes concentraciones: 60%, 65%, 70%, 75% y 80%.
- Filtrar las soluciones, agregarlas a los viales respectivos y colocar los viales en el cromatógrafo.
- Programar 3 corridas para los estándares al 60%, 65%, 75% y 80%

- Programar 5 corridas para el estándar al 70%
- Correr el método propuesto
- Al mostrar los resultados de cada una, estos deberán comportarse como una línea recta y su coeficiente de correlación deberá estar entre 0,99 y 1. Si se cumplen estas condiciones, entonces el método es lineal.

3.7.5.2. Material y equipo

- Cromatógrafo líquido de alta resolución
- Computadora para programación del método de análisis
- Viales para almacenamiento y análisis de muestra
- Jeringas
- Filtros

3.7.5.3. Reactivos

- Solventes
- Estándares de Propineb

3.7.6. Determinación de la exactitud del método

La exactitud se determinó utilizando una muestra al azar, en esta se mide la distancia o cercanía que hay entre la concentración teórica (70%) y la concentración determinada por cromatografía líquida de alta resolución de Propineb, utilizando el método propuesto.

3.7.6.1. Procedimiento

- Elegir una muestra de Propineb
- Preparar la solución de Propineb al 70%
- Filtrar la solución y agregarla en un vial
- Programar el método en la computadora
- Programar 10 corridas para la muestra de Propineb
- Obtenidos los resultados del análisis, calcular porcentaje de error relativo.
- Los resultados del error relativo no deberán ser mayores al 3%. Si esto se cumple, entonces el método es exacto.

3.7.6.2. Material y equipo

- Cromatógrafo líquido de alta resolución
- Computadora para programación del método de análisis
- Viales para almacenamiento y análisis de muestra
- Jeringas
- Filtros

3.7.6.3. Reactivos

- Solventes
- Estándares de Propineb

3.7.7. Determinación de la precisión del método

Consiste en obtener los mismos resultados para mediciones diferentes. Se utilizaron estándares de Propineb para determinar la precisión del método analítico.

3.7.7.1. Procedimiento

- Preparar solución con estándar de Propineb
- Filtrar solución
- Agregarla al vial
- Colocarla en cromatógrafo
- Hacer correr el método propuesto de análisis
- Programar 10 corridas
- Los resultados obtenidos deberán ser cercanos entre sí, su desviación no tendrá que ser mayor al 3%. Si esto se cumple, entonces el método es preciso.

3.7.7.2. Material y equipo

- Cromatógrafo líquido de alta resolución
- Computadora para programación del método de análisis
- Viales para almacenamiento y análisis de muestra
- Jeringas
- Filtros

3.7.7.3. Reactivos

- Solventes
- Estándares de Propineb

3.7.8. Determinación de la especificidad del método

El producto a analizar para la validación del método cuenta con dos compuestos en su formulación, por políticas de la empresa donde se está realizando el estudio no se pueden dar los nombres de estos; por lo que se les nombrará de la siguiente manera: ingrediente activo (Propineb) y compuesto B.

3.7.8.1. Procedimiento

- Preparar soluciones de Propineb al 70%
- Correr el método propuesto con la fase de extracción del Propineb
- Correr el método propuesto con la fase de extracción junto con el compuesto B.

- Correr el método propuesto con la fase de extracción junto con el ingrediente activo.
- Comparar los cromatogramas de cada compuesto y determinar cuál pico corresponde al ingrediente activo.

3.7.8.2. Material y equipo

- Cromatógrafo líquido de alta resolución
- Computadora para programación del método de análisis
- Viales para almacenamiento y análisis de muestra
- Jeringas
- Filtros

3.7.8.3. Reactivos

- Solventes
- Muestras de Propineb

3.7.9. Determinación de los límites de cuantificación y detección

La determinación de estos límites se hará por un método gráfico. En la calibración se obtiene una gráfica de área versus concentración, esta proporciona los límites correspondientes necesarios.

3.7.10. Determinación de la robustez del método

La robustez hace referencia a la estabilidad del método, las muestras y los estándares durante un tiempo determinado. Por eso se procederá de la siguiente manera:

3.7.10.1. Procedimiento

- Elegir un estándar al azar
- Prepararlo en solución
- Programar 3 corridas en el método y hacerlo correr
- Elegir una muestra al azar
- Prepararla en solución al 70%
- Programar 3 corridas en el método y hacerlo correr
- Repetir los pasos anteriores con la misma muestra y estándar durante 5 días, si la desviación de los resultados es menor al 3% entonces el método es robusto.

3.7.10.2. Material y equipo

- Cromatógrafo líquido de alta resolución
- Computadora para programación del método de análisis

- Viales para almacenamiento y análisis de muestra
- Jeringas
- Filtros

3.7.10.3. Reactivos

- Solventes
- Muestras de Propineb

3.7.11. Análisis de muestras por volumetría

Consiste en mostrar el procedimiento, los materiales y el equipo a utilizar para el correcto análisis de muestras por volumetría para su posterior comparación con el método por cromatografía líquida de alta resolución.

3.7.11.1. Procedimiento

- En un earlenmeyer de 100 mL agregar una cantidad de Propineb
- En el earlenmeyer agregar 25 mL de agua desmineralizada
- Agregar hidróxido de amonio a la solución
- Añadir una tableta buffer en el earlenmeyer
- Titular con EDTA hasta que la muestra se torne de color verde y se quede estable durante un mínimo de 30 segundos.

3.7.11.2. Material y equipo

- Earlenmeyers
- Pipetas
- Buretas
- Perilla de succión
- Soporte universal

3.7.11.3. Reactivos

- Muestra de Propineb
- Hidroxido de amonio
- Tableta buffer
- Earlenmeyer

3.7.12. Tabulación de resultados

Se presentan los datos en tablas para un correcto ordenamiento y fácil interpretación de los mismos, necesarios para alcanzar los objetivos planteados.

Tabla II. Resultados de la calibración del equipo

Estándar	Corrida	Resultado (%)	Promedio (%)	Diferencia (%) ($\leq 3\%$)
E1	1	R_{11}	X_1	D'_1
	2	R_{12}		
	3	R_{13}		
E2	1	R_{21}	X_2	D'_2
	2	R_{22}		
	3	R_{23}		
E3	1	R_{31}	X_3	D'_3
	2	R_{32}		
	3	R_{31}		

Fuente: elaboración propia.

Tabla III. **Resultados de los ensayos para determinación de la linealidad del método**

Estándar	Concentración	Corrida	Resultado (%)	Promedio (%)
1	60%	1	R ₁₁	X ₁
		2	R ₁₂	
		3	R ₁₃	
2	65%	1	R ₂₁	X ₂
		2	R ₂₂	
		3	R ₂₃	
3	70%	1	R ₃₁	X ₃
		2	R ₃₂	
		3	R ₃₃	
4	75%	1	R ₄₁	X ₄
		2	R ₄₂	
		3	R ₄₃	
5	80%	1	R ₅₁	X ₅
		2	R ₅₂	
		3	R ₅₃	

Fuente: elaboración propia.

Tabla IV. **Resultados de los ensayos para determinación de la exactitud del método**

Muestra	Corrida	Resultado (%)
1	1	R ₁
	2	R ₂
	3	R ₃
	4	R ₄
	5	R ₅
	6	R ₆
	7	R ₇
	8	R ₈
	9	R ₉
	10	R ₁₀

Fuente: elaboración propia.

Tabla V. **Resultados de los ensayos para determinación de la precisión del método**

Estándar	Corrida	Resultado (%)
E2	1	R ₁
	2	R ₂
	3	R ₃
	4	R ₄
	5	R ₅
	6	R ₆
	7	R ₇
	8	R ₈
	9	R ₉
	10	R ₁₀

Fuente: elaboración propia.

Tabla VI. **Límites de cuantificación y detección**

	Resultado (ppm)
Límite de cuantificación	R _{LC}
Límite de detección	R _{LD}

Fuente: elaboración propia.

Tabla VII. **Comparación entre los resultados de análisis cromatográfico y volumétrico del porcentaje de Propineb en las muestras**

Lote	Muestra	%Propineb	
		Cromatografía	Volumetría
1	A	A ₁	V _{1A}
	B	B ₁	V _{1B}
	C	C ₁	V _{1C}
	D	D ₁	V _{1D}
	E	E ₁	V _{1E}
2	A	A ₂	V _{2A}
	B	B ₂	V _{2B}
	C	C ₂	V _{2C}
	D	D ₂	V _{2D}
	E	E ₂	V _{2E}
3	A	A ₃	V _{3A}
	B	B ₃	V _{3B}
	C	C ₃	V _{3C}
	D	D ₃	V _{3D}
	E	E ₃	V _{3E}
4	A	A ₄	V _{4A}
	B	B ₄	V _{4B}
	C	C ₄	V _{4C}
	D	D ₄	V _{4D}
	E	E ₄	V _{4E}

Fuente: elaboración propia.

Tabla VIII. **Comparación entre resultados de análisis cromatográfico y volumétrico de las muestras de Propineb (tiempo de respuesta y desechos)**

Lote	Muestra	Tiempo de respuesta (min)		Desechos (mL)	
		Cromatografía	Volumetría	Cromatografía	Volumetría
1	A	t_{1A}	t_{1A}	D_{1A}	D_{1A}
	B	t_{1B}	t_{1B}	D_{1B}	D_{1B}
	C	t_{1C}	t_{1C}	D_{1C}	D_{1C}
	D	t_{1D}	t_{1D}	D_{1D}	D_{1D}
	E	t_{1E}	t_{1E}	D_{1E}	D_{1E}
2	A	t_{2A}	t_{2A}	D_{2A}	D_{2A}
	B	t_{2A}	t_{2A}	D_{2B}	D_{2B}
	C	t_{2A}	t_{2A}	D_{2C}	D_{2C}
	D	t_{2A}	t_{2A}	D_{2D}	D_{2D}
	E	t_{2A}	t_{2A}	D_{2E}	D_{2E}
3	A	t_{3A}	t_{3A}	D_{3A}	D_{3A}
	B	t_{3B}	t_{3B}	D_{3B}	D_{3B}
	C	t_{3C}	t_{3C}	D_{3C}	D_{3C}
	D	t_{3D}	t_{3D}	D_{3D}	D_{3D}
	E	t_{3E}	t_{3E}	D_{3E}	D_{3E}
4	A	t_{4A}	t_{4A}	D_{4A}	D_{4A}
	B	t_{4B}	t_{4B}	D_{4B}	D_{4B}
	C	t_{4C}	t_{4C}	D_{4C}	D_{4C}
	D	t_{4D}	t_{4D}	D_{4D}	D_{4D}
	E	t_{4E}	t_{4E}	D_{4E}	D_{4E}

Fuente: elaboración propia.

Tabla IX. Comparación de costos para ambos métodos analíticos

Tipo de Costo		Costo (Q/L)	
		Volumetría	Cromatografía
Reactivos	EDTA	Q_{V1}	-----
	Hidróxido de amonio	Q_{V2}	-----
	Tabletas buffer	Q_{V3}	-----
	Agua	Q_{V4}	Q_{C1}
	Acetonitrilo	----	Q_{C2}
	Ácido fosfórico	----	Q_{C3}
	Metanol	----	Q_{C4}
Total		T_v	T_c

Fuente: elaboración propia.

Tabla X. Resultados de los parámetros de la validación

Parámetro	Resultado	Cumple (Si / No)
Exactitud	Media	Si/No
Precisión	S	Si/No
Especificidad	-----	Si/No
Límite de detección	LD	Si/No
Límite de cuantificación	LC	Si/No
Linealidad	R'	Si/No
Robustez	CV	Si/No

Fuente: elaboración propia.

Tabla XI. **Porcentajes de reducción entre ambos métodos**

	Volumetría	Cromatografía	Reducción (%)
Tiempo de respuesta de análisis promedio (min)	t_v	t_c	$\%_t$
Costos totales (Q)	T_v	T_c	$\%_Q$
Desechos totales (mL)	D_v	D_c	$\%_D$
Error relativo por método (%)	Er_v	Er_c	$\%_E$

Fuente: elaboración propia.

Tabla XII. **Eficiencia de los métodos analíticos**

	Volumetría	Cromatografía	Aumento eficiencia (%)
Eficiencia (%)	Ef_v	Ef_c	Ef_T

Fuente: elaboración propia.

3.8. Análisis estadístico

Se realizaron los ensayos hasta lograr que los valores principales de control de calidad estuvieran dentro de los rangos de límite máximos aceptables, esto se logró por correcciones al método propuesto, calibrando correctamente el equipo y un conocimiento amplio de los programas estadísticos que se están utilizando. La relación estadística dependió de la proximidad entre los valores de los parámetros exigidos para la validación del método al porcentaje de Propineb en las muestras.

El método será sometido a pruebas estadísticas de validación, como lo son la Q de Dixon, la prueba de Neuman y la de Horwitz; para descartar datos y verificar la linealidad del mismo.

4. RESULTADOS

4.1. Calibración de equipo

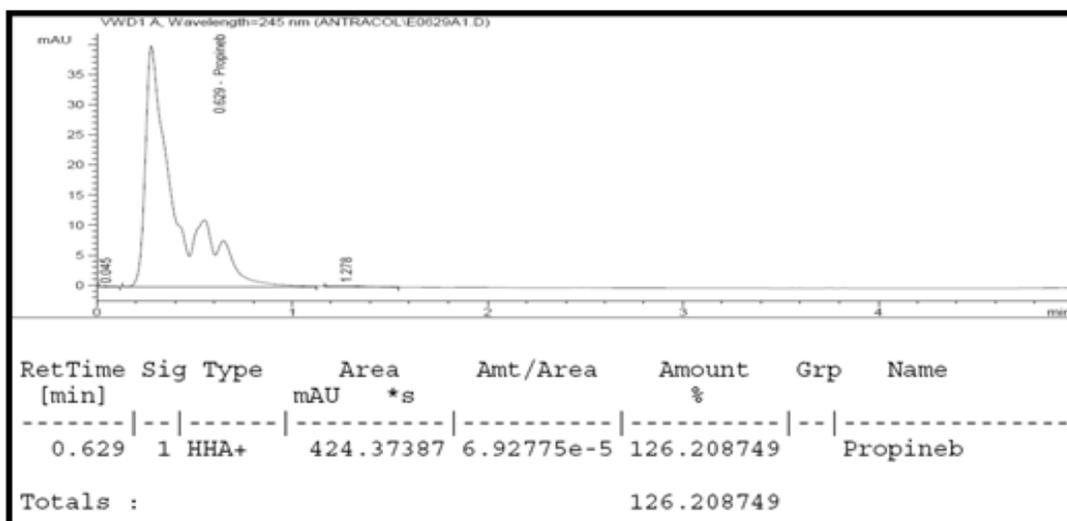
La tabla XIII muestra los resultados obtenidos cuando se calibró el equipo, previo a la determinación de los parámetros de validación. También se presentan los respectivos cromatogramas para los resultados de la tabla antes mencionada.

Tabla XIII. **Resultados de calibración del equipo**

Estándar	Corrida	Resultado (%)	Promedio (%)	Diferencia (\leq 3%)
E1	1	126,208749	120,3022973	20,6240506
	2	120,712904		
	3	113,985239		
E2	1	100,000000	99,67082467	2,853343663
	2	100,023510		
	3	98,988964		
E3	1	102,370566	102,6471427	
	2	102,785431		
	3	102,785431		

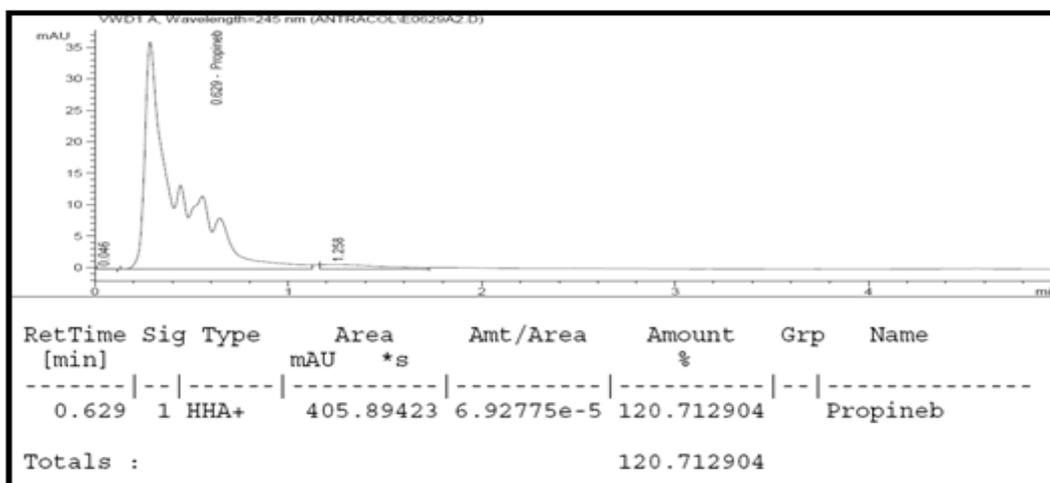
Fuente: elaboración propia con información de la tabla II.

Figura 2. **Cromatograma de la corrida 1 del estándar E1**



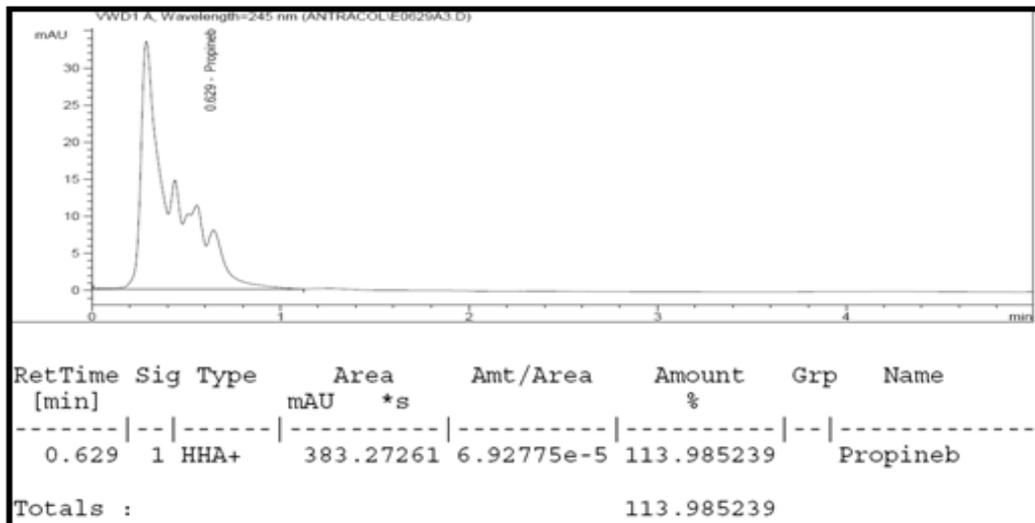
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIII.

Figura 3. **Cromatograma de la corrida 2 del estándar E1**



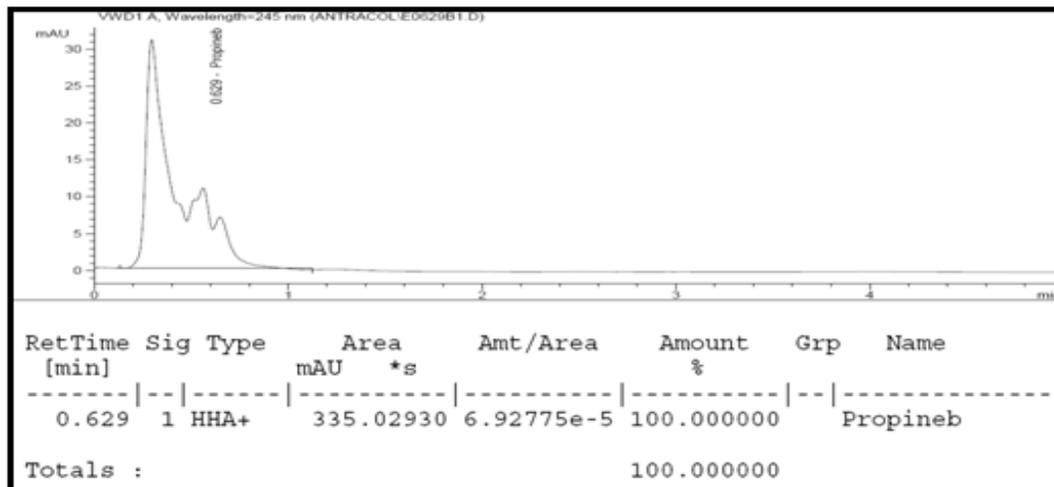
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIII.

Figura 4. **Cromatograma de la corrida 3 del estándar E1**



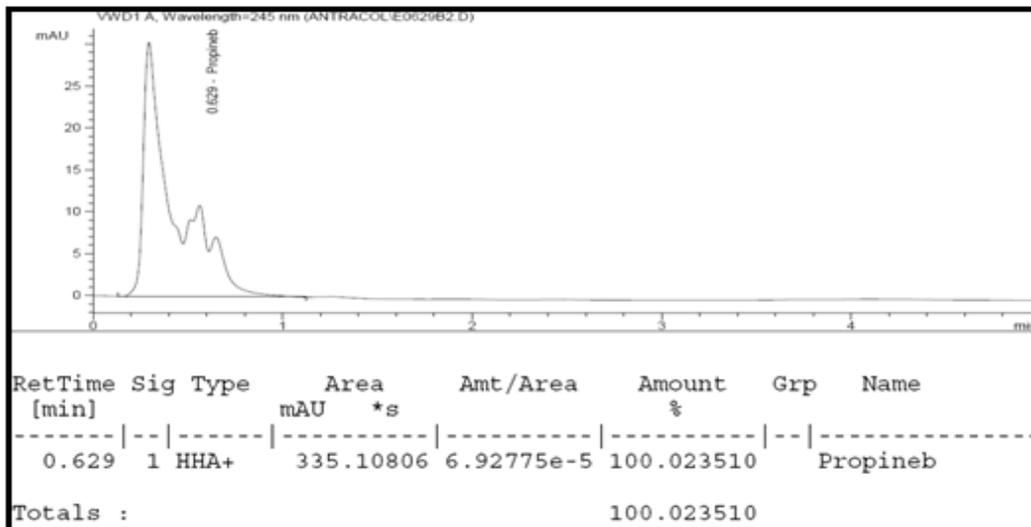
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIII.

Figura 5. **Cromatograma de la corrida 1 del estándar E2**



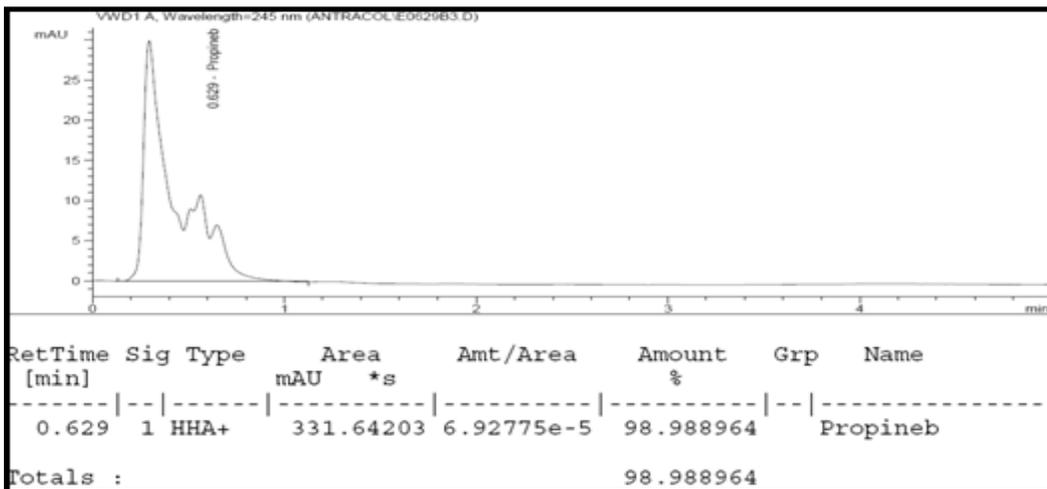
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIII.

Figura 6. Cromatograma de la corrida 2 del estándar E2



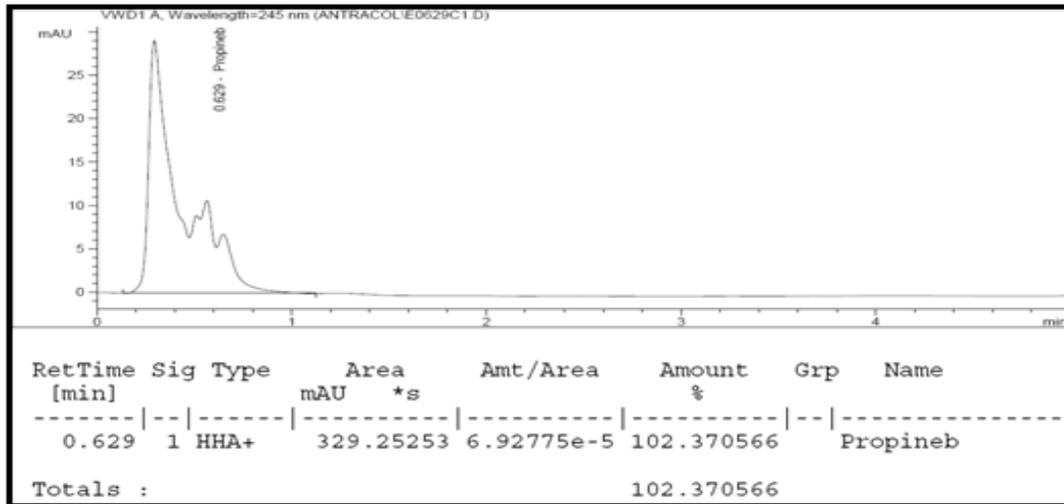
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIII.

Figura 7. Cromatograma de la corrida 3 del estándar E2



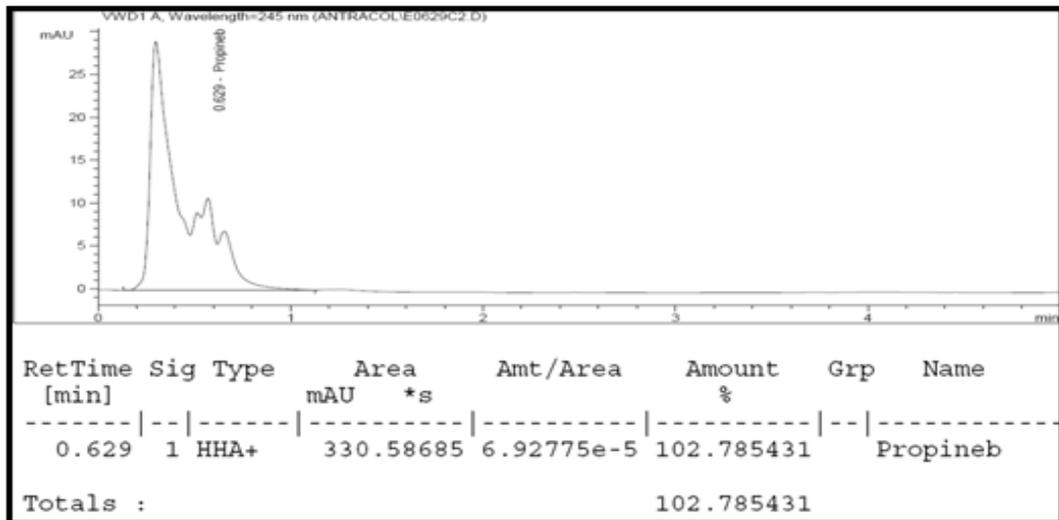
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIII.

Figura 8. Cromatograma de la corrida 1 del estándar E3



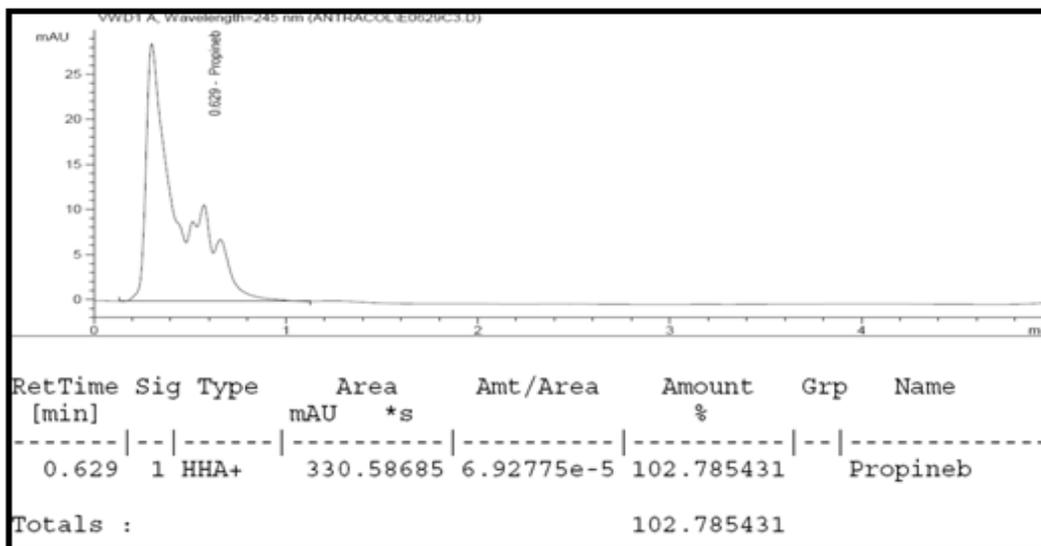
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIII.

Figura 9. Cromatograma de la corrida 2 del estándar E3



Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIII.

Figura 10. Cromatograma de la corrida 3 del estándar E3



Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIII.

4.2. Linealidad

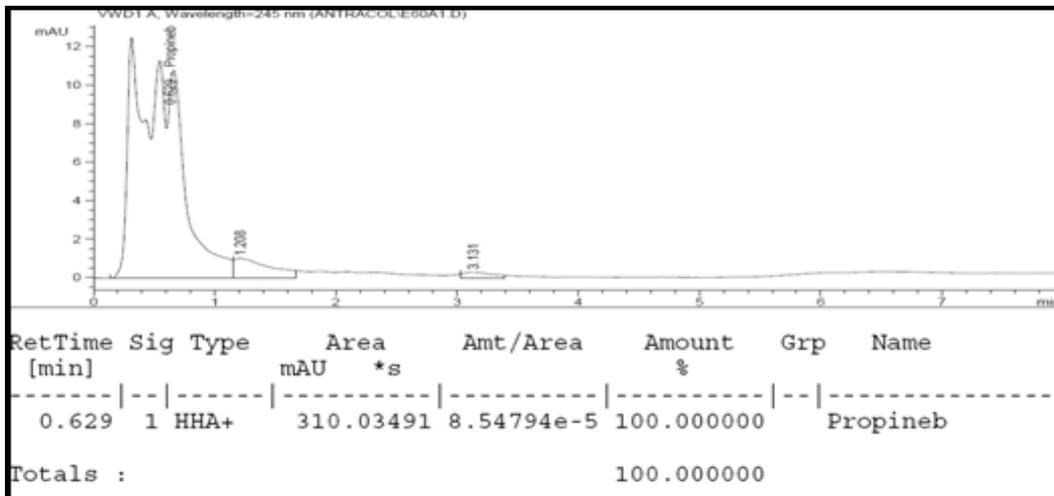
La tabla XIV muestra los resultados obtenidos para la linealidad del método. También se presentan los respectivos cromatogramas para los resultados de la tabla antes mencionada.

Tabla XIV. **Resultados de los ensayos para determinación de la linealidad del método**

Estándar	Concentración	Corrida	Resultado	Promedio
1	60%	1	100,000000	99,49207433
		2	99,603507	
		3	98,872716	
2	65%	1	100,898065	100,8279677
		2	100,764123	
		3	100,821765	
3	70%	1	96,028816	97,161229
		2	97,112761	
		3	98,342110	
4	75%	1	99,192048	97,32152867
		2	96,471345	
		3	96,301193	
5	80%	1	95,728260	94,73113067
		2	94,763566	
		3	93,701566	

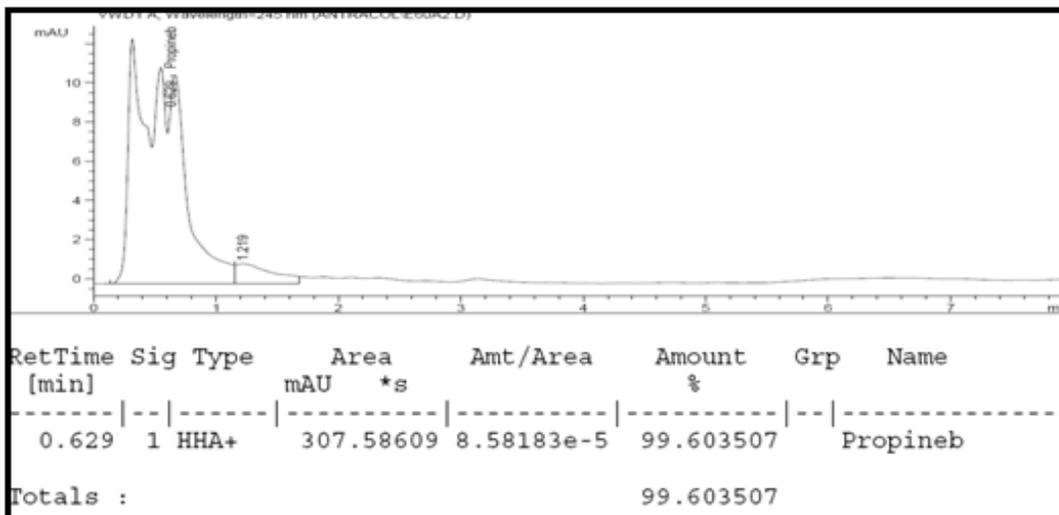
Fuente: elaboración propia con información de la tabla III.

Figura 11. Cromatograma de la corrida 1 del estándar al 60%



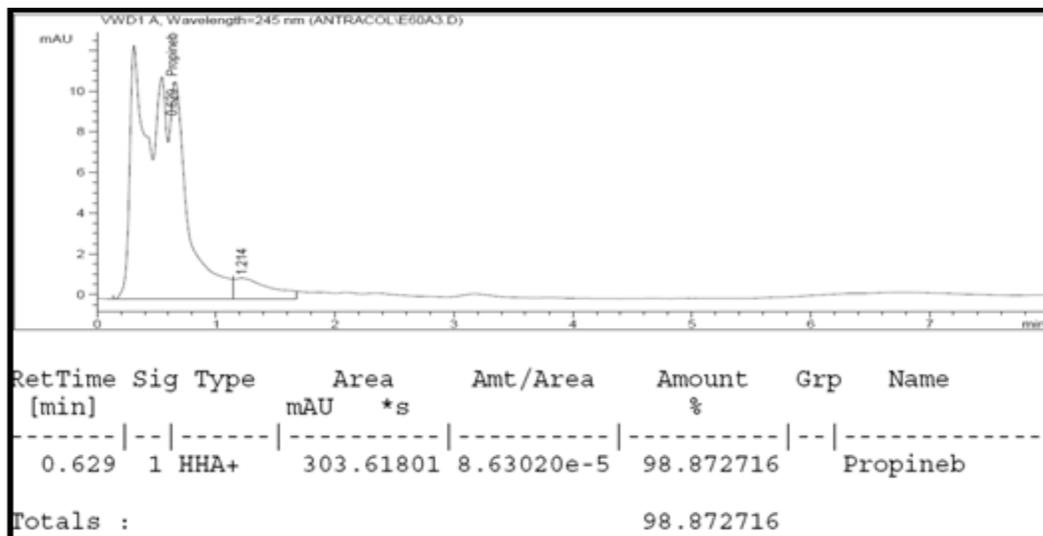
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIV.

Figura 12. Cromatograma de la corrida 2 del estándar al 60%



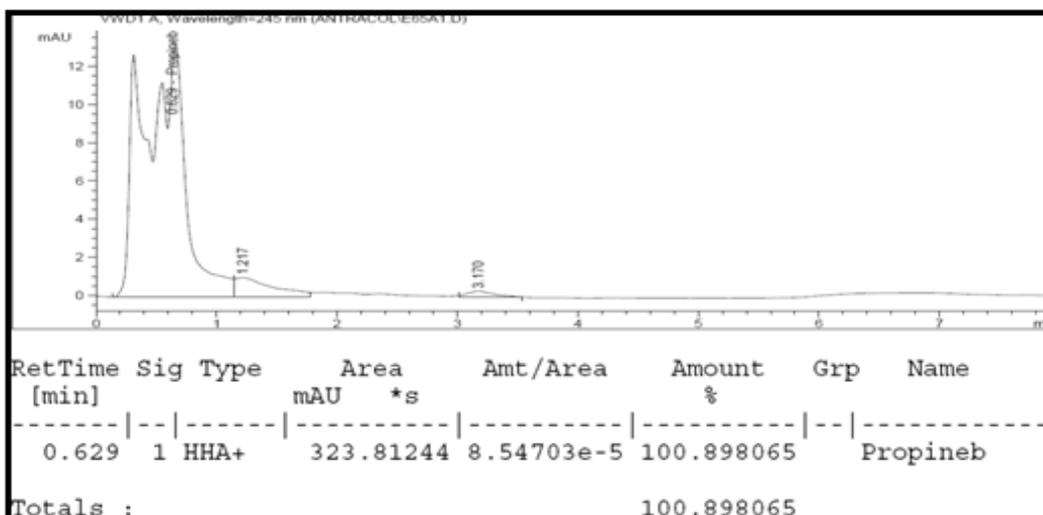
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIV.

Figura 13. Cromatograma de la corrida 3 del estándar al 60%



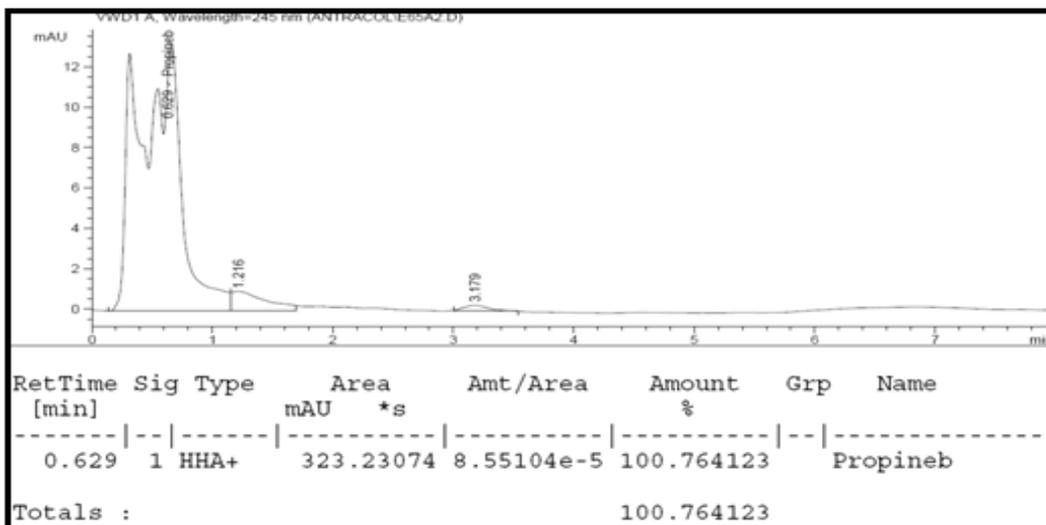
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIV.

Figura 14. Cromatograma de la corrida 1 del estándar al 65%



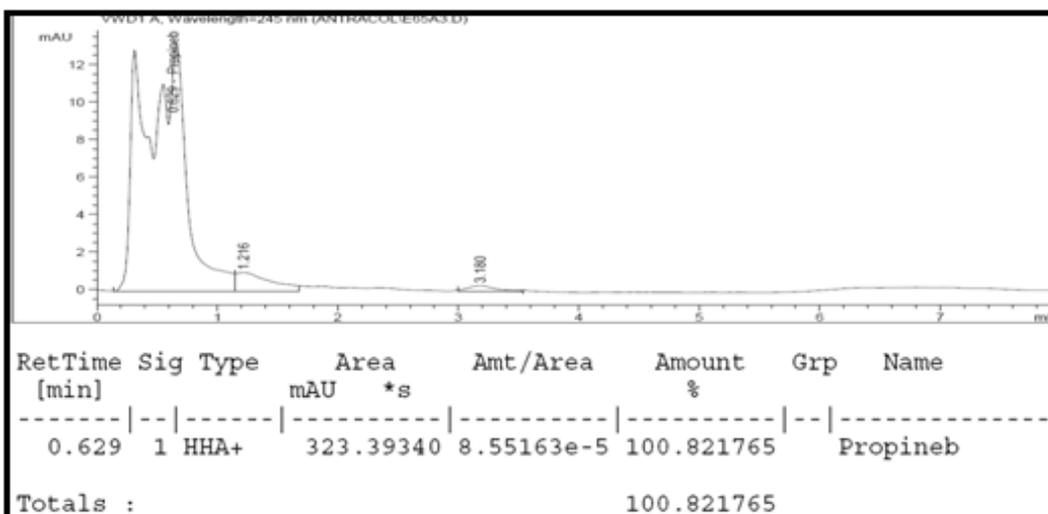
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIV.

Figura 15. Cromatograma de la corrida 2 del estándar al 65%



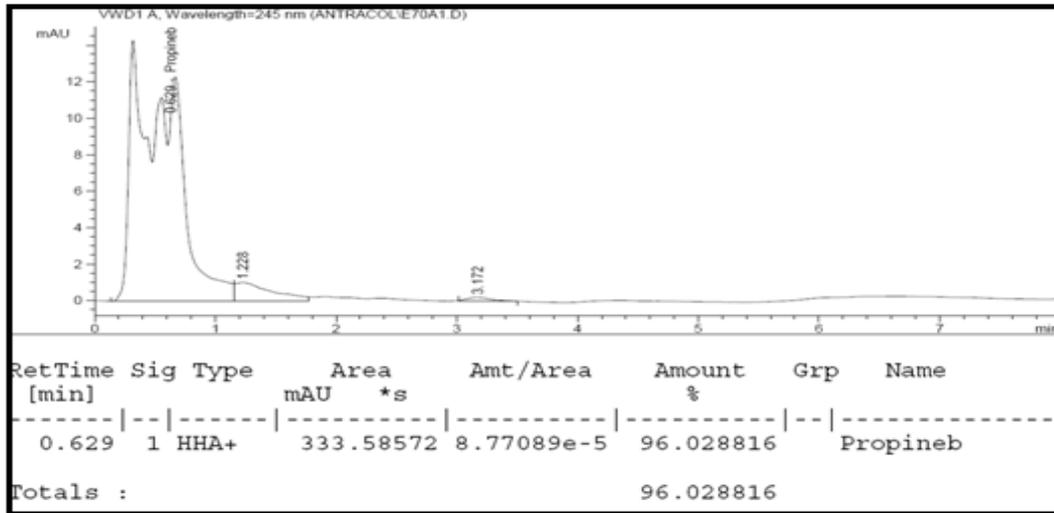
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIV.

Figura 16. Cromatograma de la corrida 3 del estándar al 65%



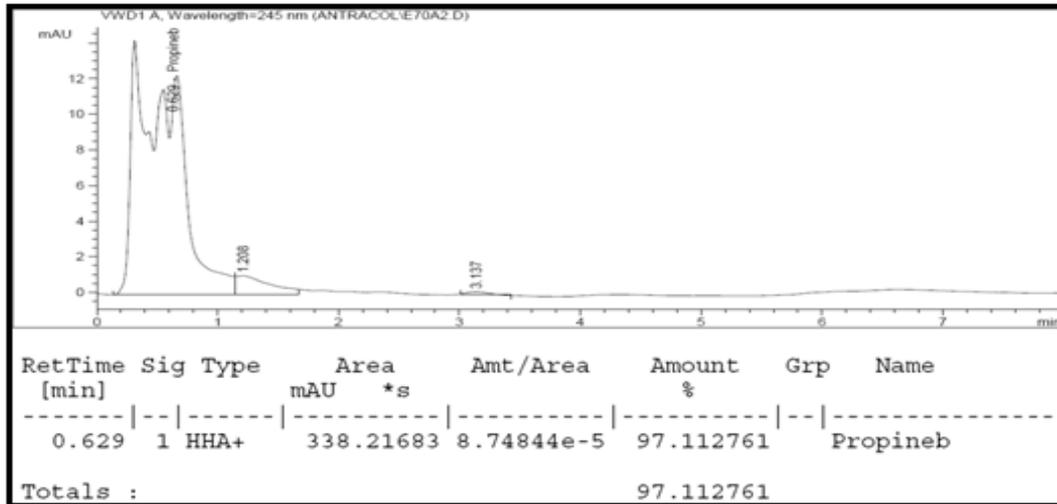
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIV.

Figura 17. Cromatograma de la corrida 1 del estándar al 70%



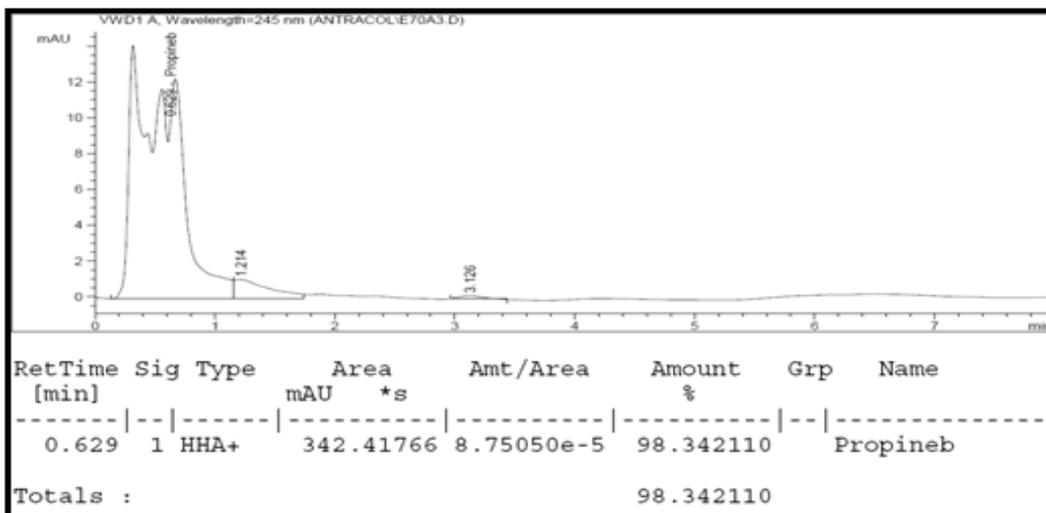
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIV.

Figura 18. Cromatograma de la corrida 2 del estándar al 70%



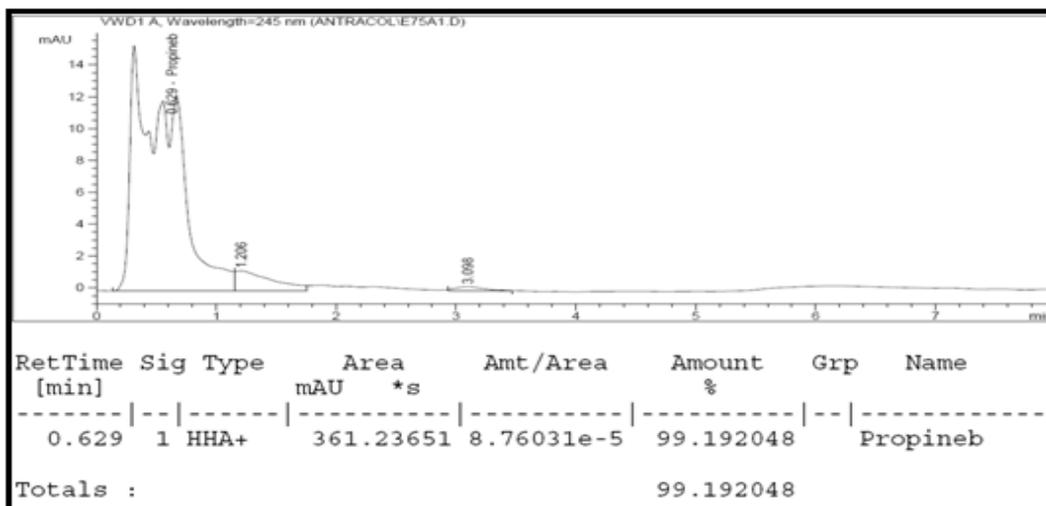
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIV.

Figura 19. Cromatograma de la corrida 3 del estándar al 70%



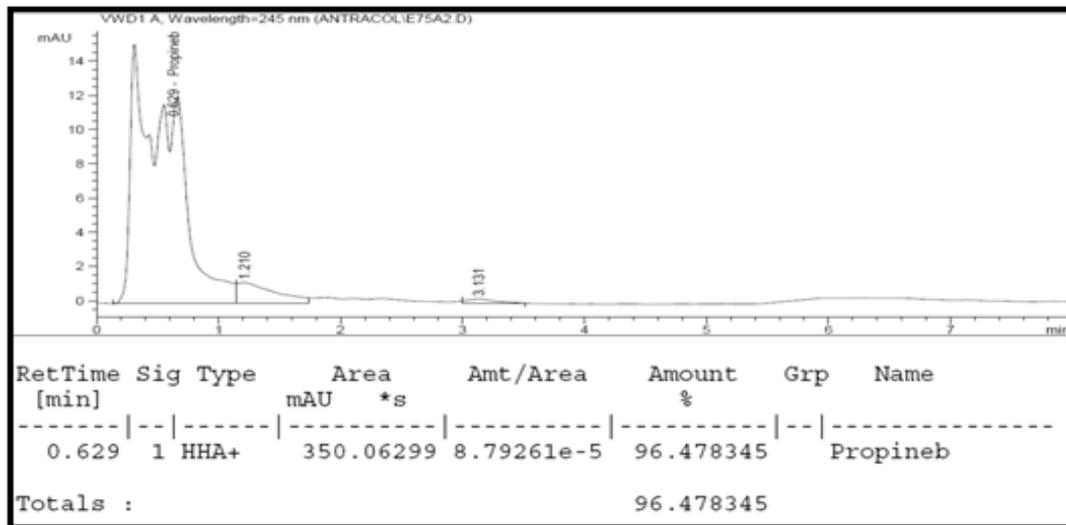
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIV.

Figura 20. Cromatograma de la corrida 1 del estándar al 75%



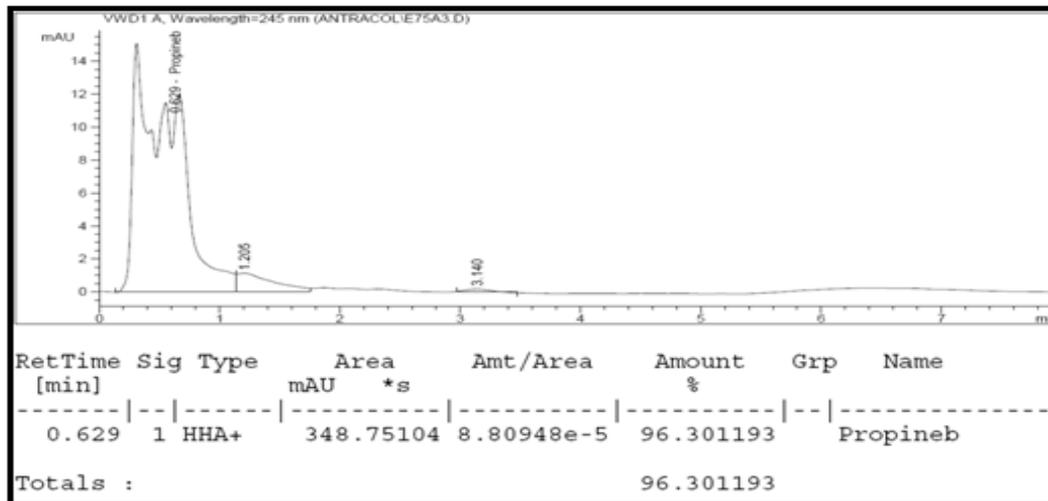
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIV.

Figura 21. Cromatograma de la corrida 2 del estándar al 75%



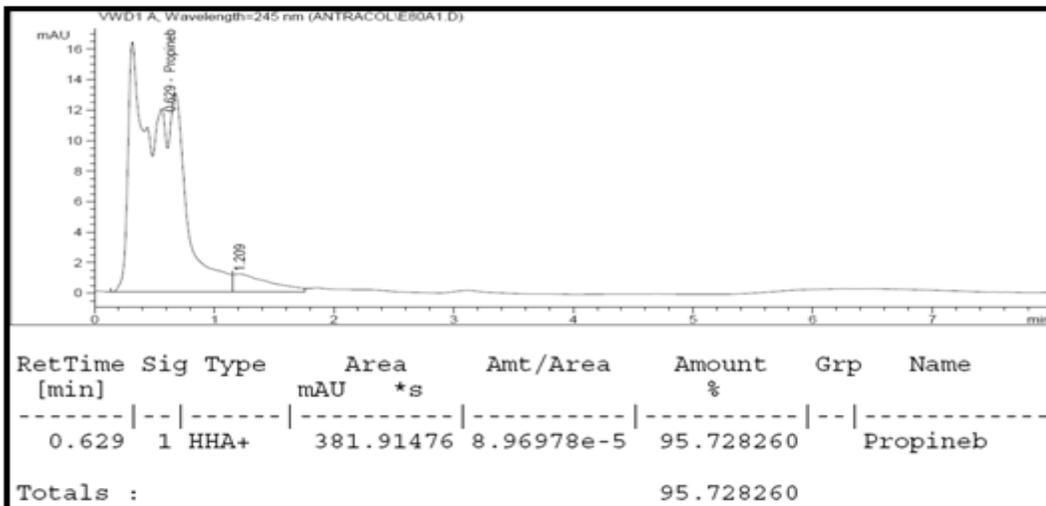
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIV.

Figura 22. Cromatograma de la corrida 3 del estándar al 75%



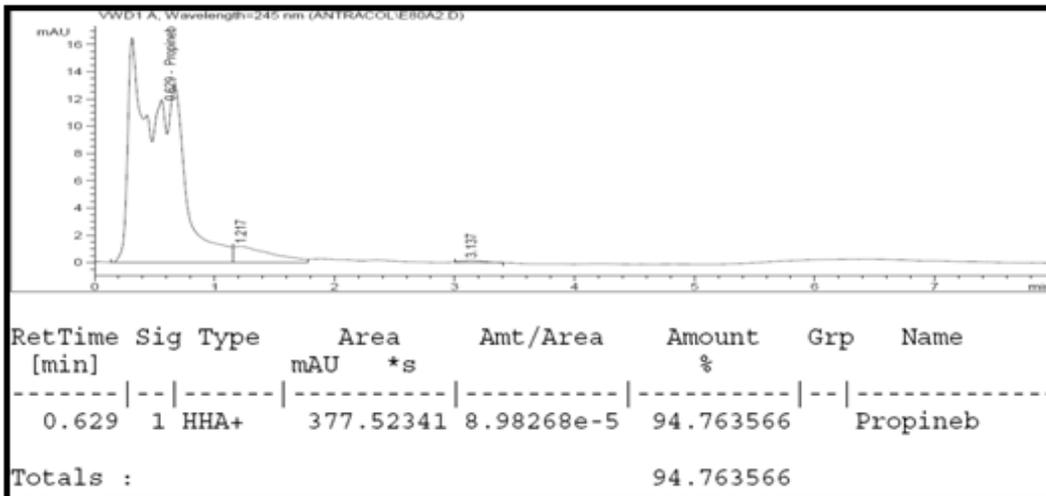
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIV.

Figura 23. Cromatograma de la corrida 1 del estándar al 80%



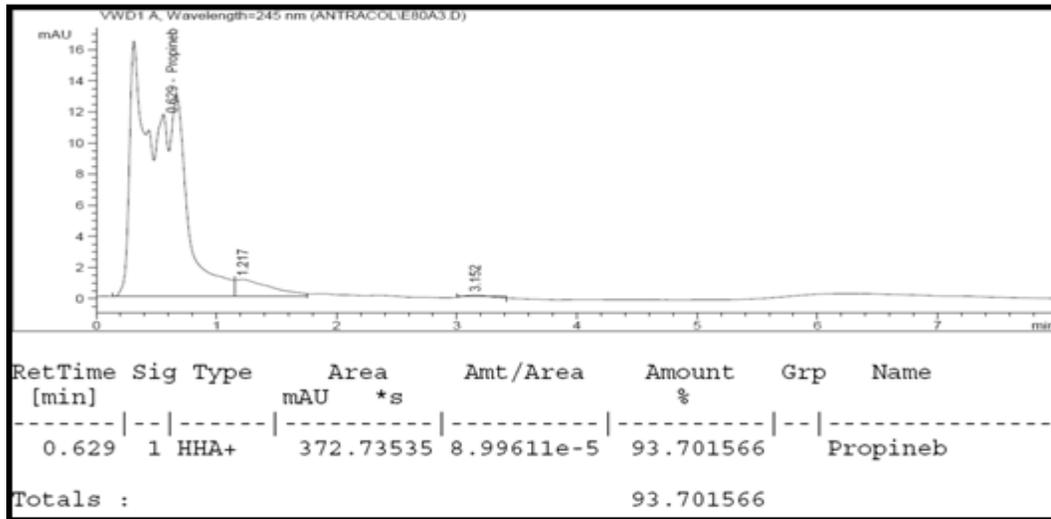
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIV.

Figura 24. Cromatograma de la corrida 2 del estándar al 80%



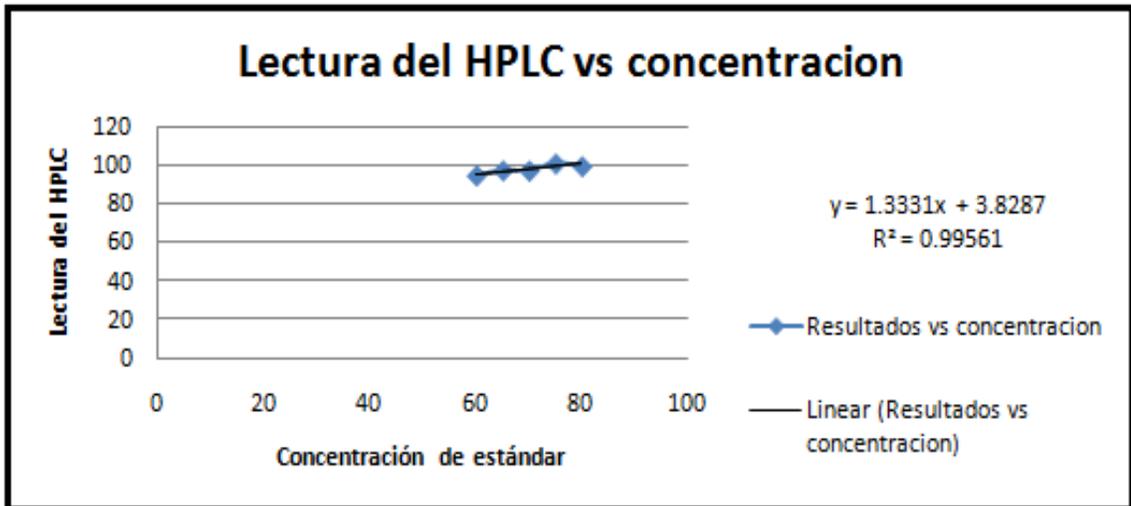
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIV.

Figura 25. Cromatograma de la corrida 3 del estándar al 80%



Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIV.

Figura 26. Linealidad del método



Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIV.

4.3. Exactitud

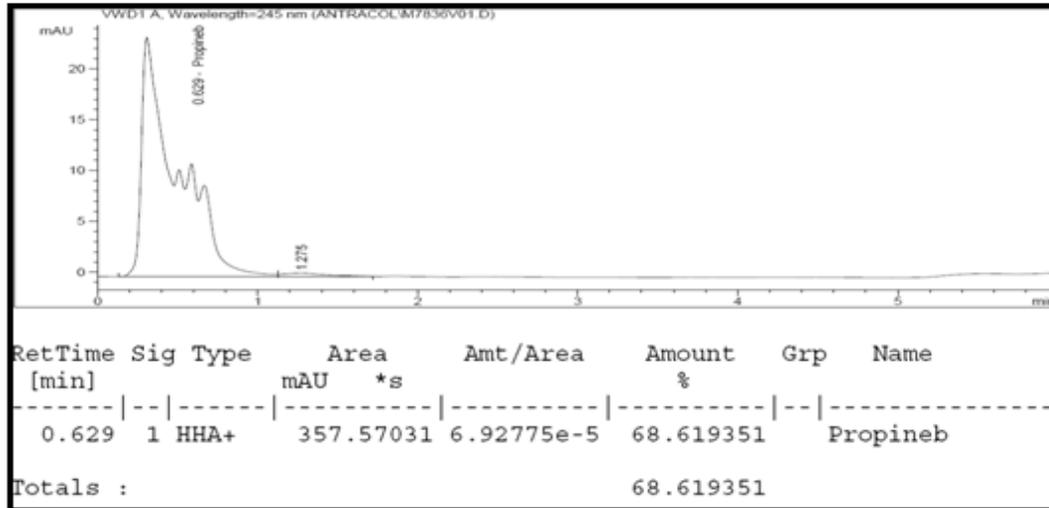
La tabla XV muestra los resultados obtenidos para la exactitud del método. También se presentan los respectivos cromatogramas para los resultados de la tabla antes mencionada.

Tabla XV. **Resultados de los ensayos para determinación de la exactitud del método**

Muestra	Corrida	Resultado
1	1	68,619351
	2	68,325837
	3	67,535426
	4	68,684399
	5	68,157663
	6	68,246341
	7	68,519042
	8	68,331934
	9	67,889349
	10	67,943615

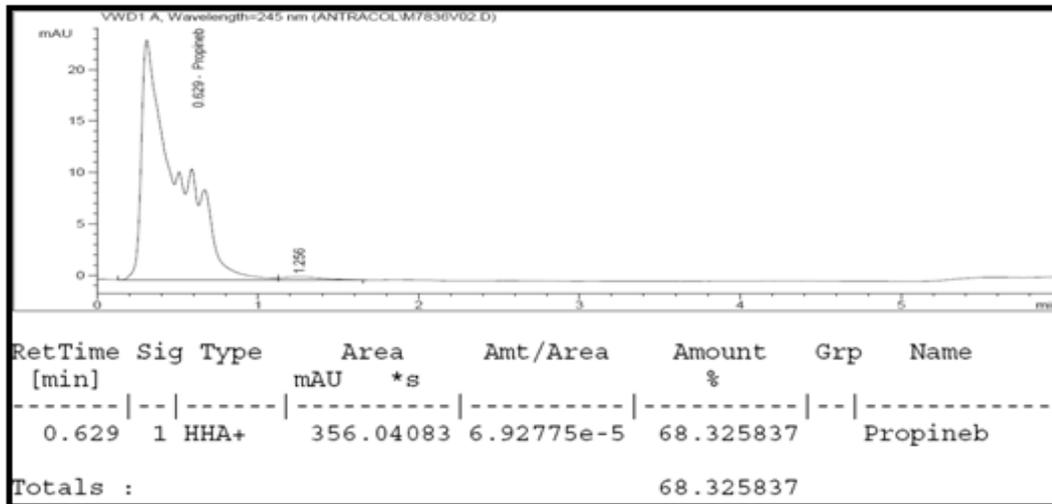
Fuente: elaboración propia con información de la tabla IV.

Figura 27. **Cromatograma de la corrida 1 de la muestra 1**



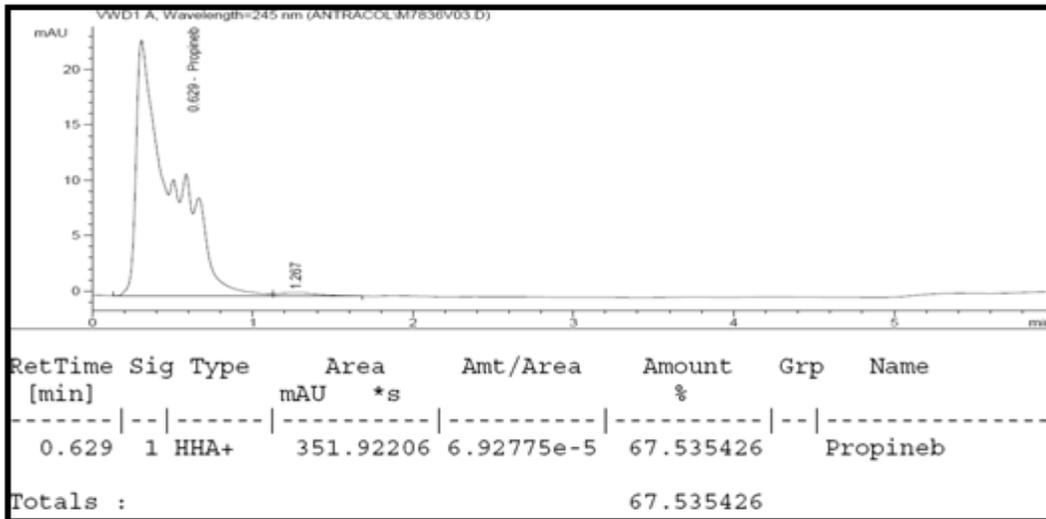
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XV.

Figura 28. **Cromatograma de la corrida 2 de la muestra 1**



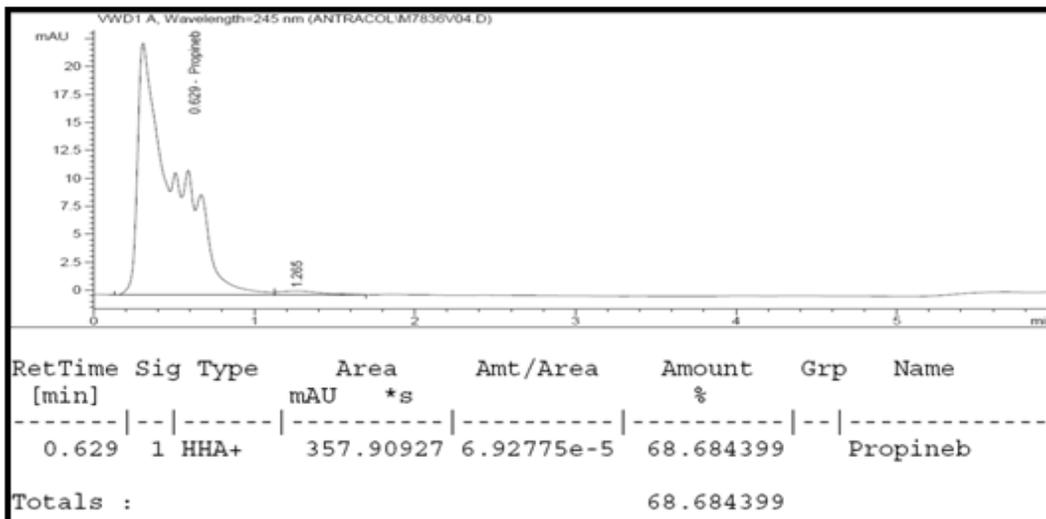
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XV.

Figura 29. Cromatograma de la corrida 3 de la muestra 1



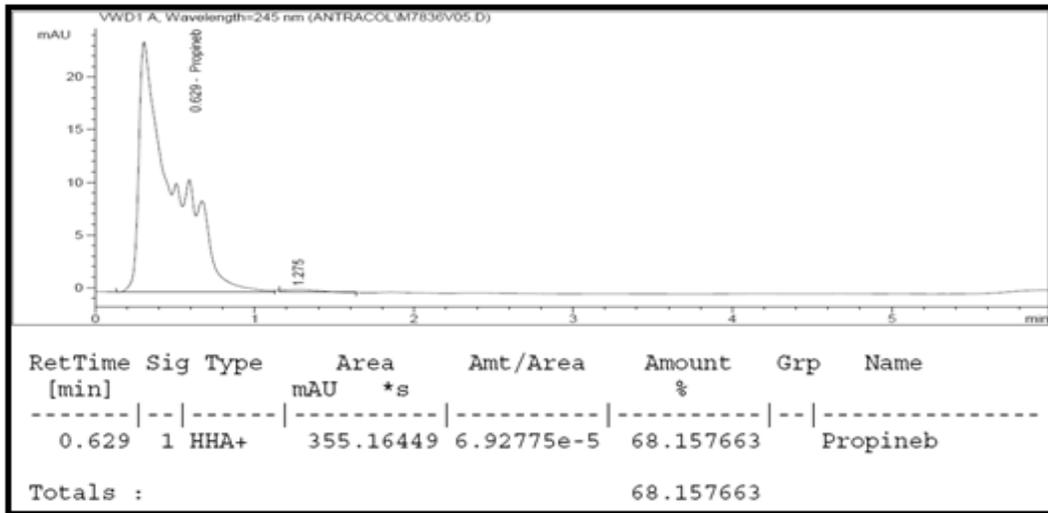
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XV.

Figura 30. Cromatograma de la corrida 4 de la muestra 1



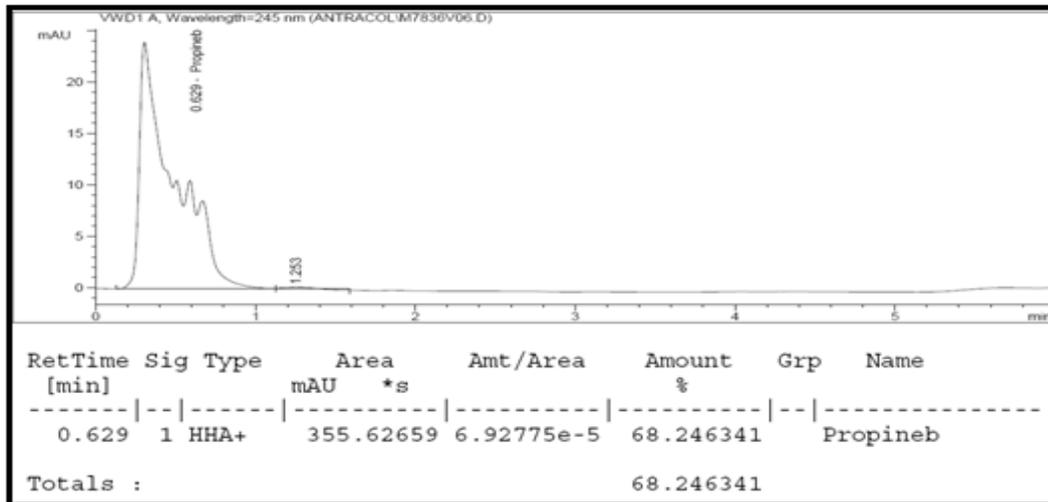
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XV.

Figura 31. Cromatograma de la corrida 5 de la muestra 1



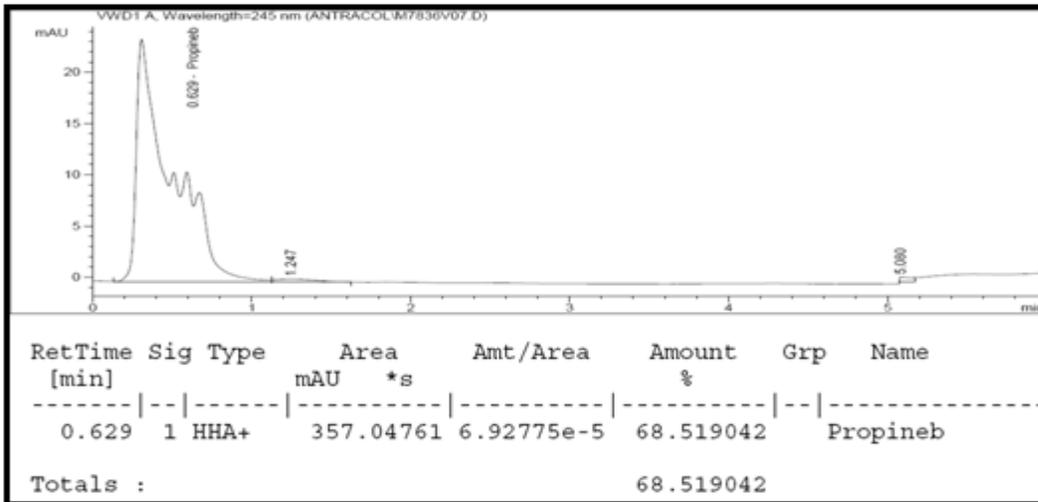
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XV.

Figura 32. Cromatograma de la corrida 6 de la muestra 1



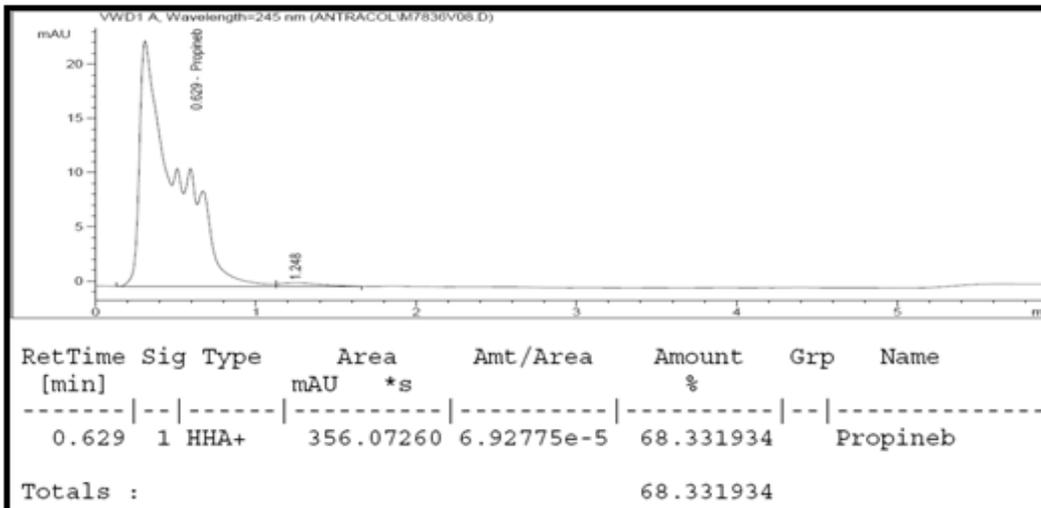
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XV.

Figura 33. Cromatograma de la corrida 7 de la muestra 1



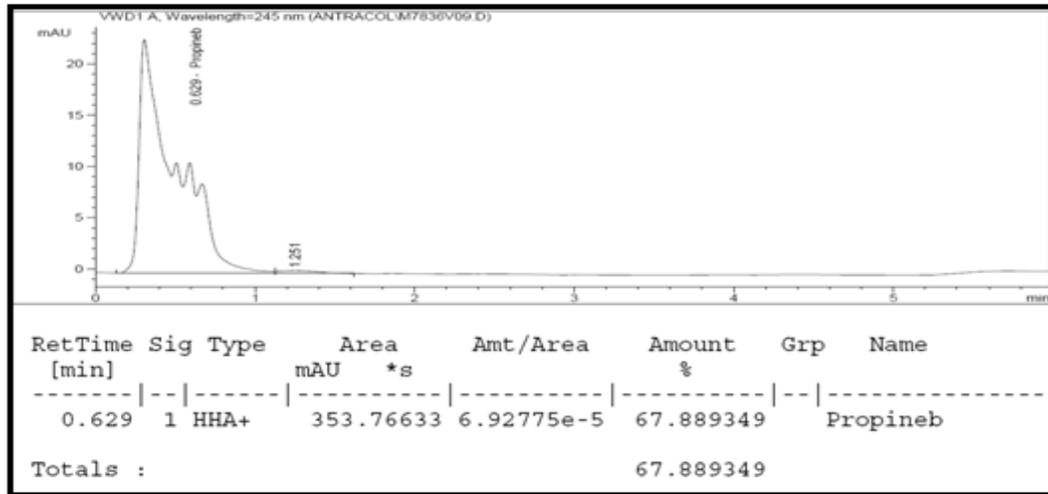
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XV.

Figura 34. Cromatograma de la corrida 8 de la muestra 1



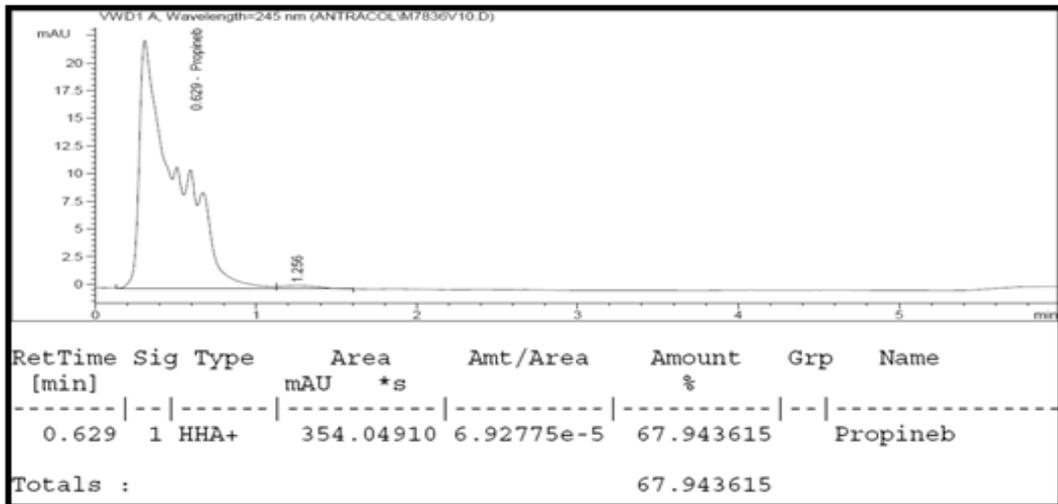
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XV.

Figura 35. Cromatograma de la corrida 9 de la muestra 1



Fuente: elaboración propia con información de la tabla XV.

Figura 36. Cromatograma de la corrida 10 de la muestra 1



Fuente: elaboración propia con información de la tabla XV.

Tabla XVI. **Resultados de las pruebas estadísticas para exactitud**

	Valor obtenido (%)	Valor esperado (%)
Prueba de Tendencia de Neumann	2,288	$\geq 1,062$
Prueba de Variación de Horwitz	0,523	$\leq 1,419$
Datos descartados. Prueba Q de Dixon	0	≤ 2

Fuente: elaboración propia con información de la tabla XV.

4.4. Precisión

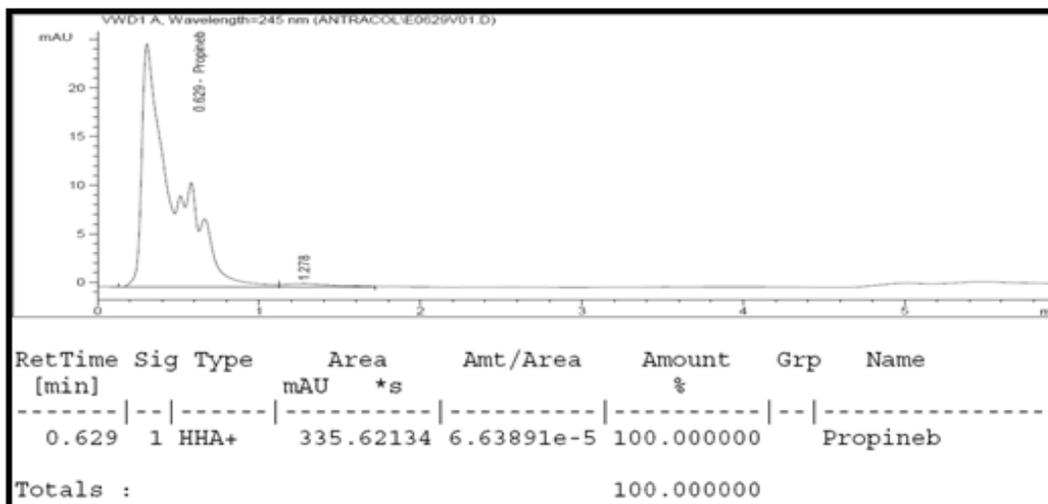
La tabla XVII muestra los resultados obtenidos para la precisión del método. También se presentan los respectivos cromatogramas para los resultados de la tabla antes mencionada.

Tabla XVII. **Resultados de los ensayos para la determinación de la precisión del método**

Estándar	Corrida	Resultado
E2	1	100,000000
	2	99,709756
	3	99,410992
	4	99,225434
	5	100,023396
	6	98,841497
	7	98,850826
	8	97,962681
	9	98,248606
	10	98.438510

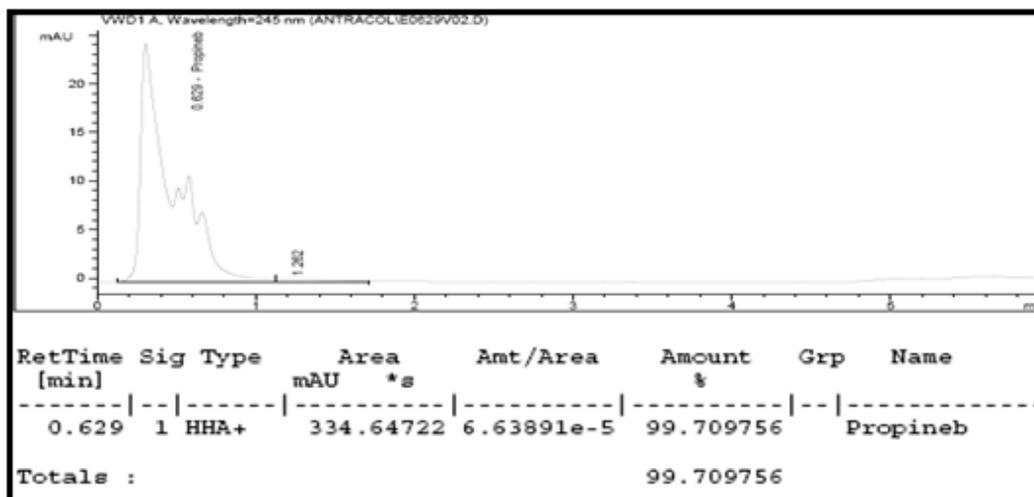
Fuente: elaboración propia con información de la tabla V.

Figura 37. Cromatograma de la corrida 1 del estándar E2



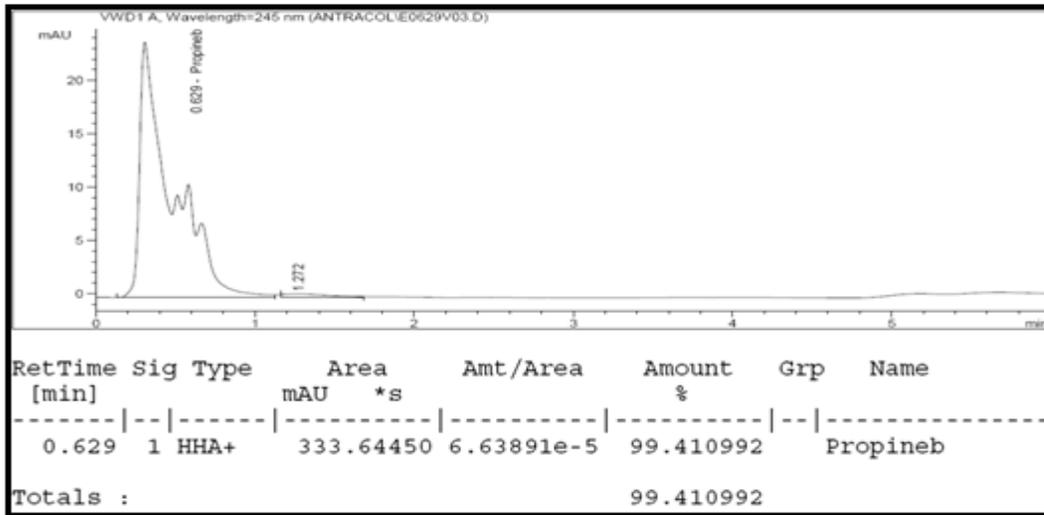
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XVII.

Figura 38. Cromatograma de la corrida 2 del estándar E2



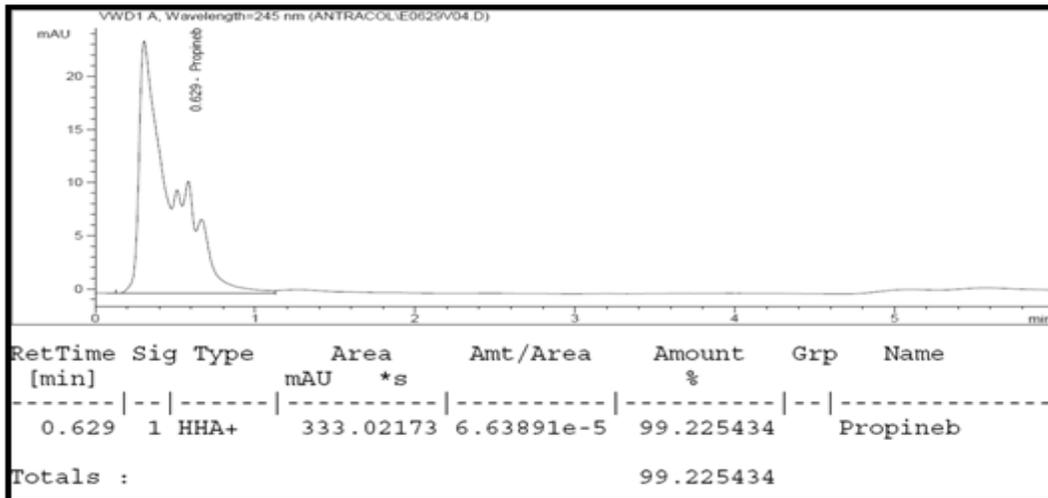
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XVII.

Figura 39. **Cromatograma de la corrida 3 del estándar E2**



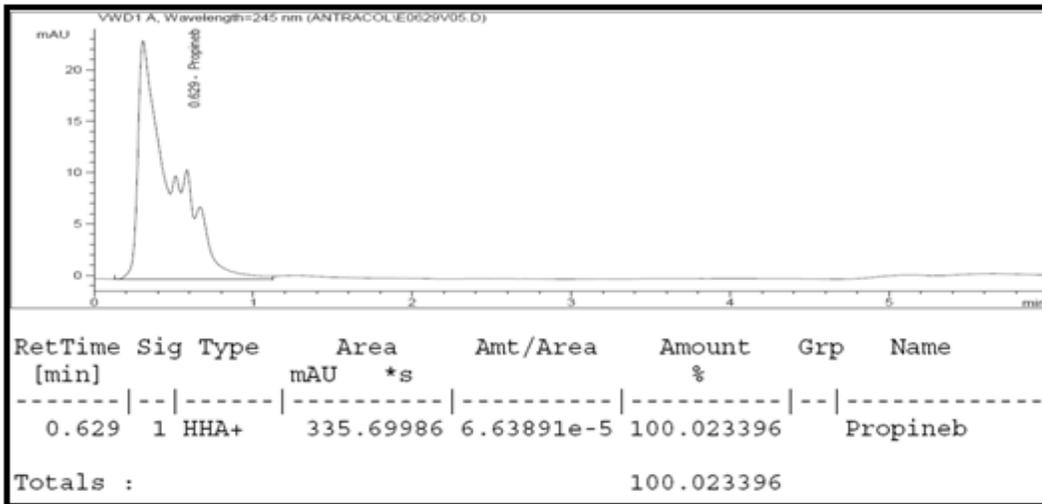
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XVII.

Figura 40. **Cromatograma de la corrida 4 del estándar E2**



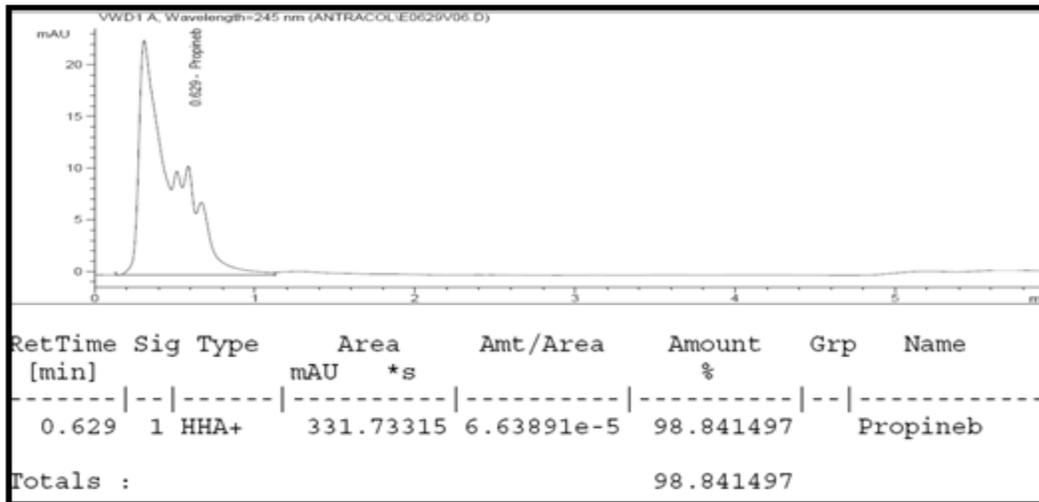
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XVII.

Figura 41. Cromatograma de la corrida 5 del estándar E2



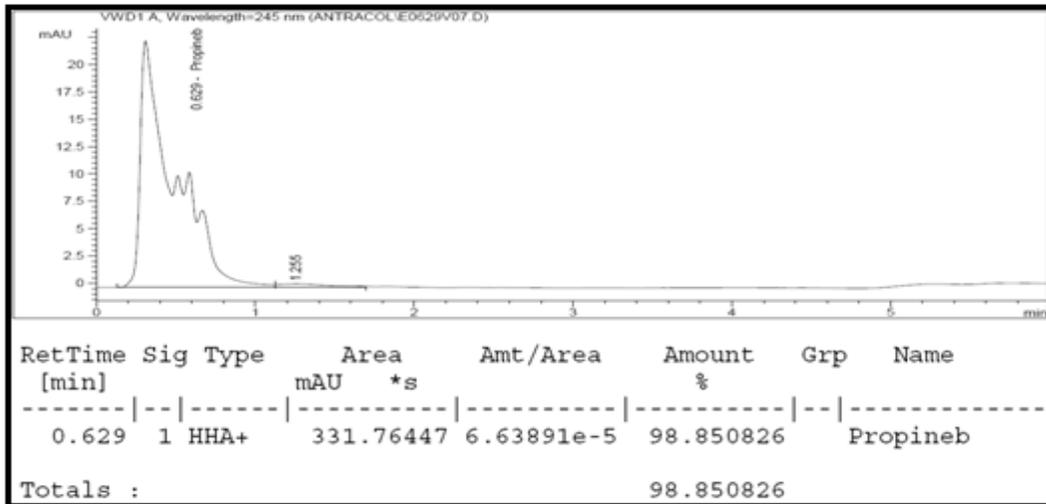
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XVII.

Figura 42. Cromatograma de la corrida 6 del estándar E2



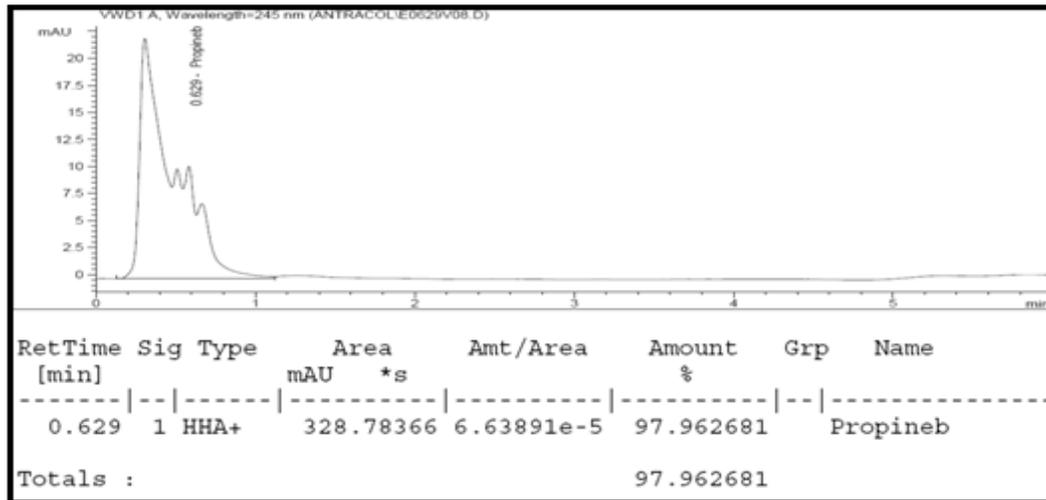
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XVII.

Figura 43. **Cromatograma de la corrida 7 del estándar E2**



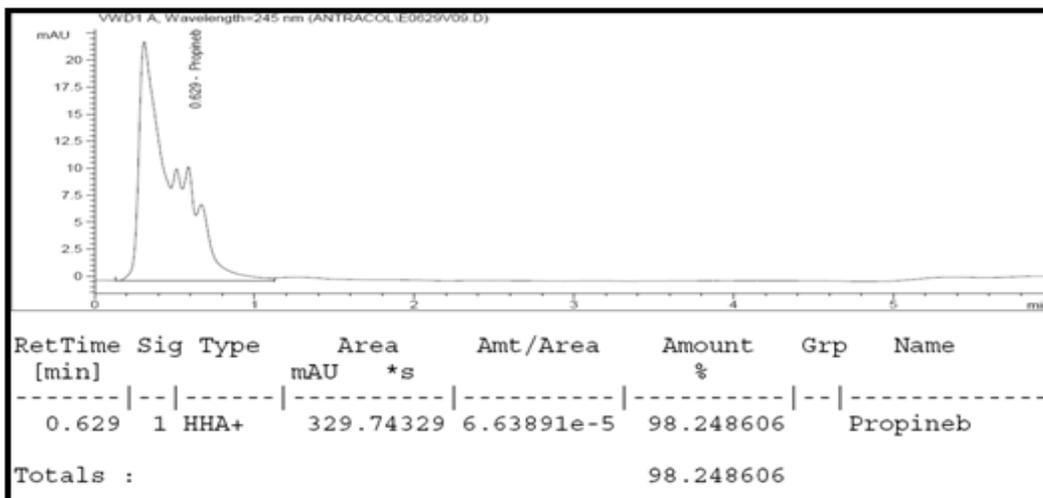
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XVII.

Figura 44. **Cromatograma de la corrida 8 del estándar E2**



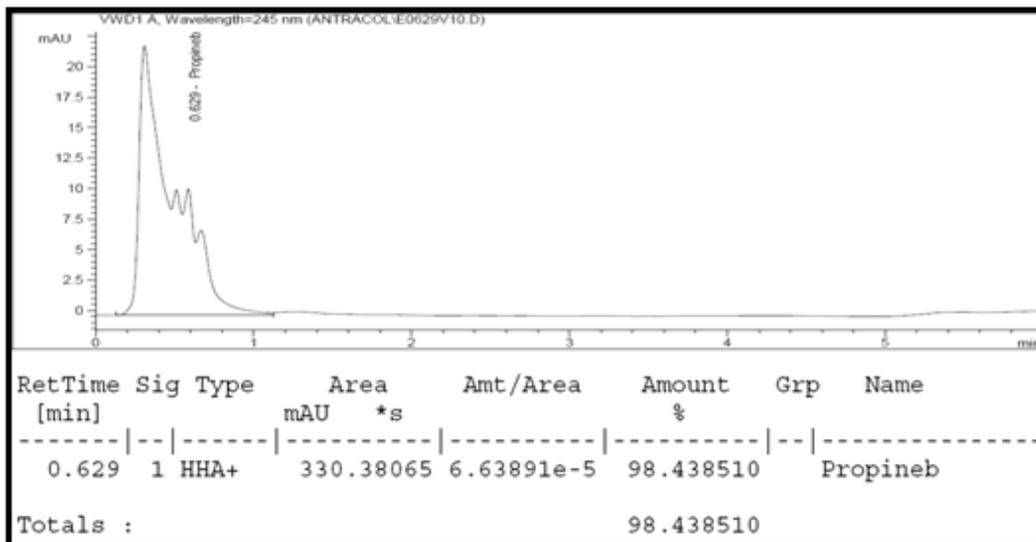
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XVII.

Figura 45. Cromatograma de la corrida 9 del estándar E2



Fuente: elaboración propia con información de la tabla XVII.

Figura 46. Cromatograma de la corrida 10 del estándar E2



Fuente: elaboración propia con información de la tabla XVII.

Tabla XVIII. **Resultados de las pruebas estadísticas para precisión**

	Valor obtenido (%)	Valor esperado (%)
Prueba de Tendencia de Neumann	1,516	$\geq 0,936$
Prueba de Variación de Horwitz	0,499	$\leq 1,341$
Datos descartados. Prueba Q de Dixon	0	≤ 2

Fuente: elaboración propia con información de la tabla XVII.

4.5. Límites de cuantificación y detección

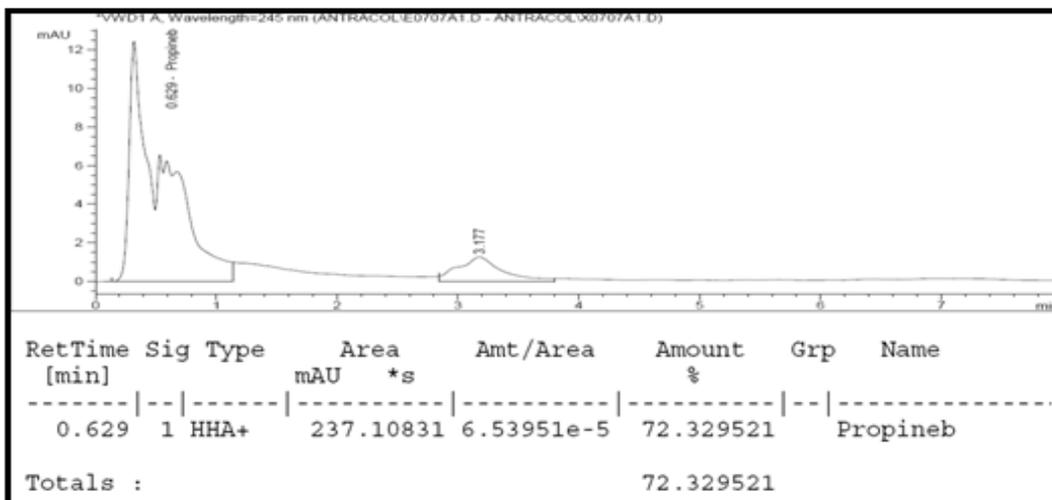
La tabla XIX muestra los resultados obtenidos para los límites de cuantificación y detección del método. También se presentan los respectivos cromatogramas para los resultados de la tabla antes mencionada.

Tabla XIX. **Límites de cuantificación y detección**

	Resultado (ppm)
Límite de cuantificación	10
Límite de detección	1

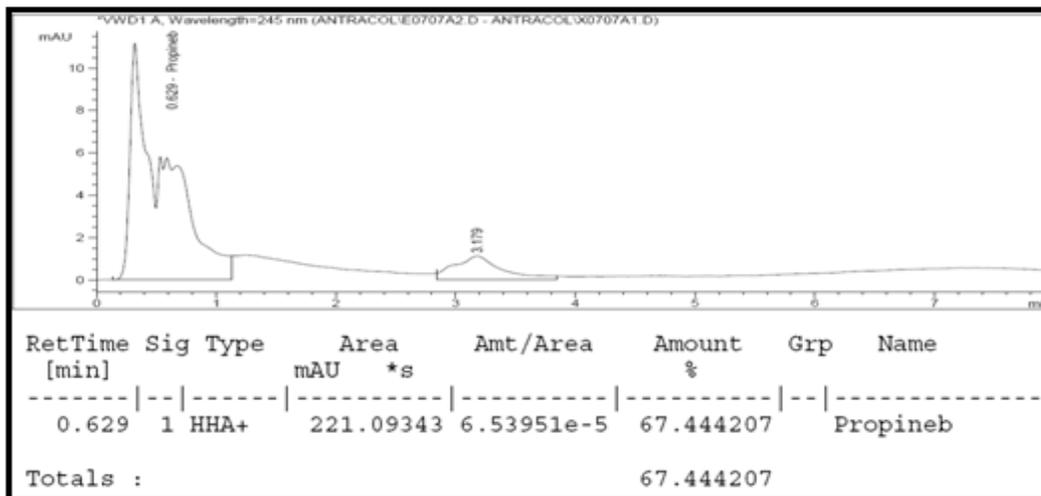
Fuente: elaboración propia con información de la tabla VI.

Figura 47. **Cromatograma de la corrida 1 de la muestra a 1 000 ppm**



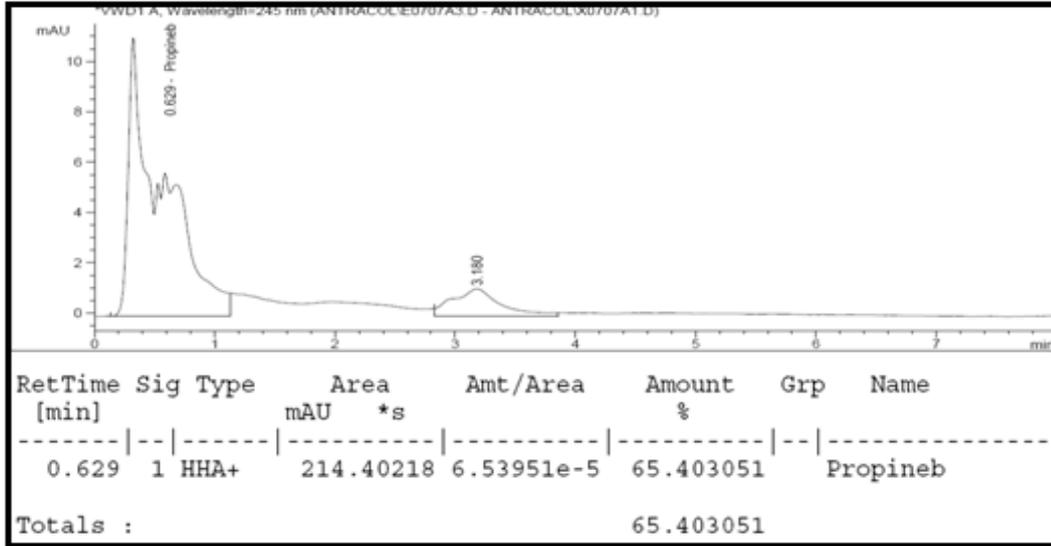
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIX.

Figura 48. **Cromatograma de la corrida 2 de la muestra a 1 000 ppm**



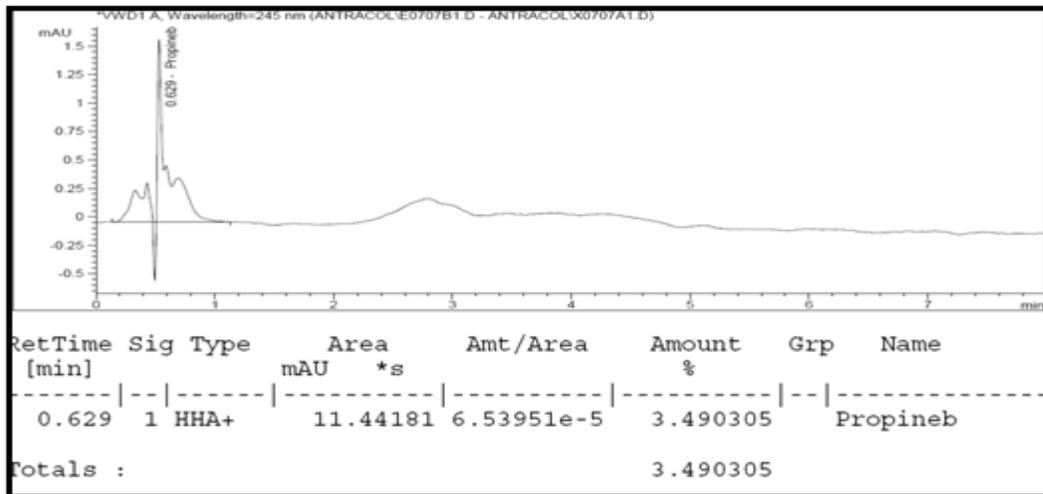
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIX.

Figura 49. Cromatograma de la corrida 3 de la muestra a 1 000 ppm



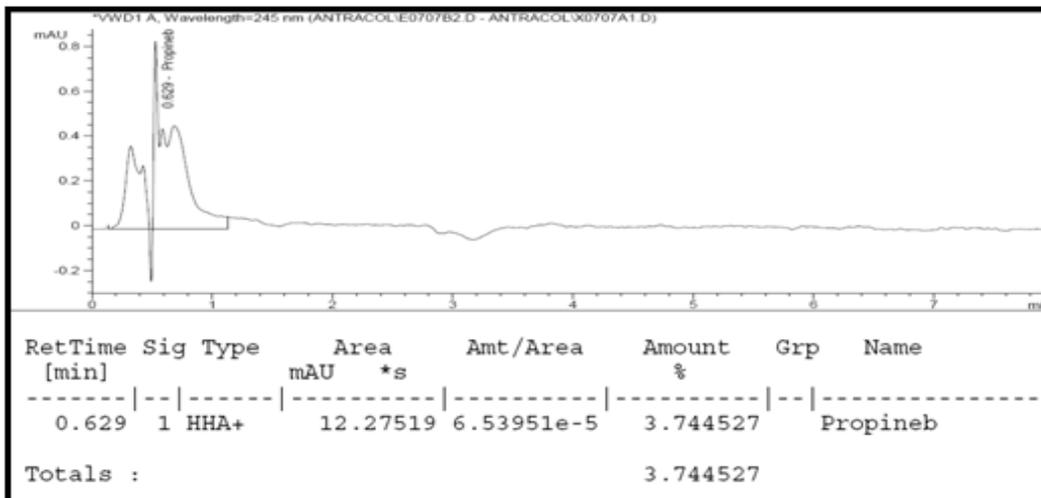
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIX.

Figura 50. Cromatograma de la corrida 1 de la muestra a 10 ppm



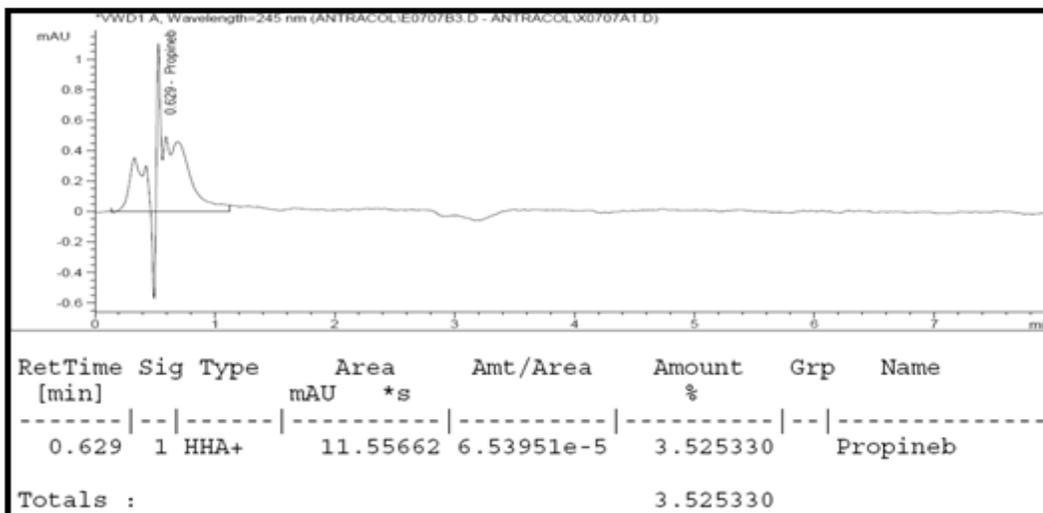
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIX.

Figura 51. Cromatograma de la corrida 2 de la muestra a 10 ppm



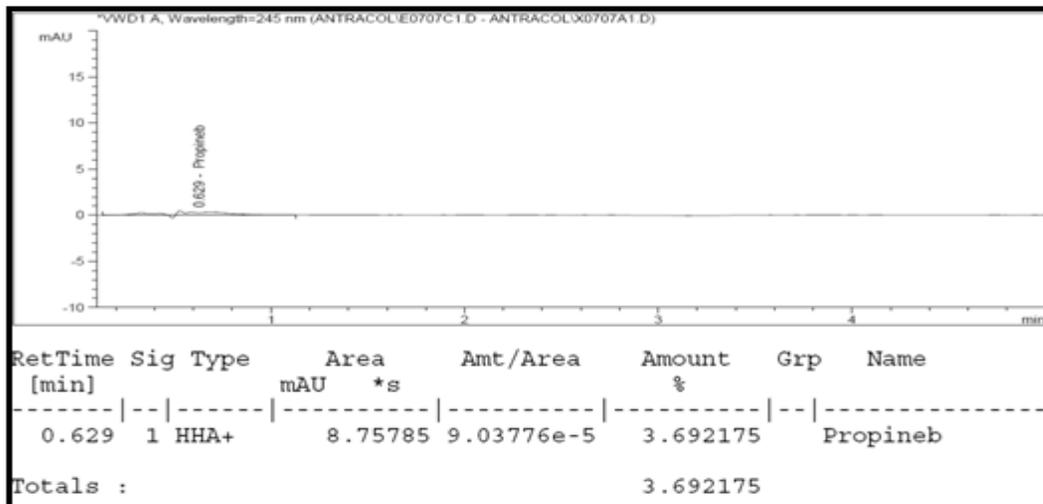
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIX.

Figura 52. Cromatograma de la corrida 3 de la muestra a 10 ppm



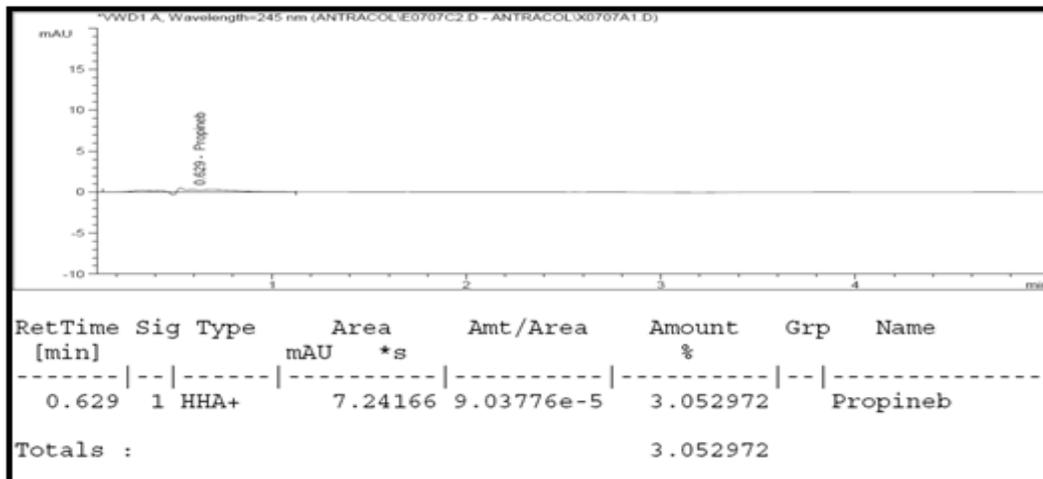
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIX.

Figura 53. Cromatograma de la corrida 1 de la muestra a 1 ppm



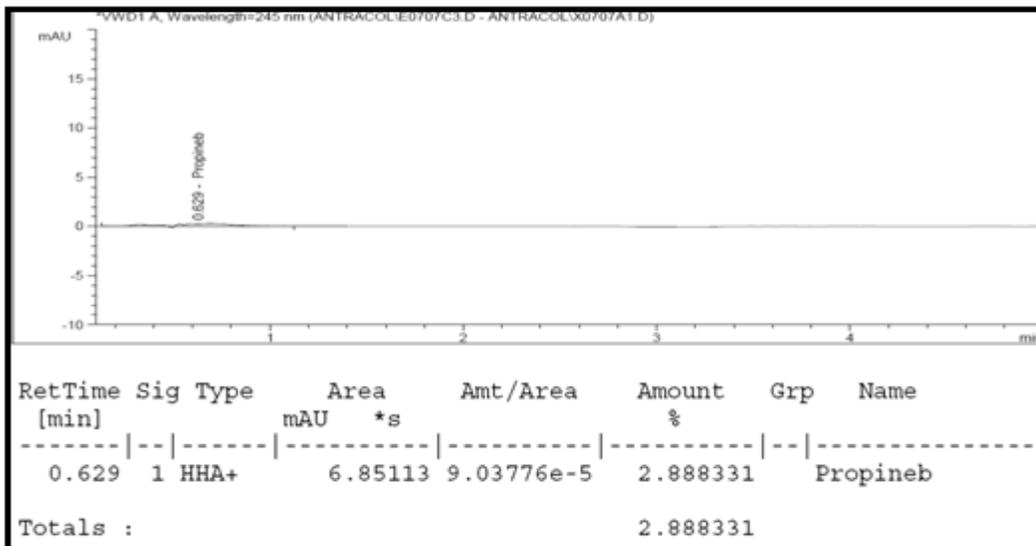
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIX.

Figura 54. Cromatograma de la corrida 2 de la muestra a 1 ppm



Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIX.

Figura 55. Cromatograma de la corrida 3 de la muestra a 1 ppm



Fuente: elaboración propia con información de la tabla XIX.

4.6. Análisis de muestras

La tabla XX muestra los resultados obtenidos para las muestras analizadas con el método propuesto, así como los resultados finales para los parámetros de validación. También se presentan los respectivos cromatogramas para los resultados de la tabla antes mencionada.

Tabla XX. **Comparación entre resultados de análisis cromatográfico y volumétrico del porcentaje de Propineb en muestras**

Lote	Muestra	%Propineb		Desviación por muestra (%)	Desviación por lote (%)
		Cromatografía	Volumetría		
1	A	68,537504	70,70	2,162496	0,653649
	B	69,248636	69,10	0,148636	
	C	70,131824	70,31	0,178176	
	D	69,247280	70,21	0,962720	
	E	70,686511	70,80	0,113489	
2	A	68,619351	70,82	2,200649	1,707910
	B	71,584603	71,45	0,134603	
	C	70,048008	72,04	1,991992	
	D	69,468251	72,00	2,531749	
	E	69,200235	71,15	1,949765	
3	A	69,863681	69,25	0,613681	0,373585
	B	69,626598	70,57	0,943402	
	C	70,61342	71,23	0,616580	
	D	71,424434	72,10	0,675566	
	E	70,883941	71,13	0,246059	
4	A	70,46889	70,65	0,181110	0,815923
	B	71,110673	72,40	1,289327	
	C	70,101699	69,24	0,861699	
	D	68,893284	69,76	0,866716	
	E	68,325837	70,93	2,604163	

Fuente: elaboración propia con información de la tabla VII.

Tabla XXI. **Resultados de análisis de varianzas (ANOVA) para muestras**

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad (GL)	Error medio cuadrado	F	Valor de P	F Crítico
Entre grupos	7,881302	1	7,881302	8,48	0,00598	4,09817
Dentro de grupos	35,316940	38	0,929393			
Total	43,198242	39				

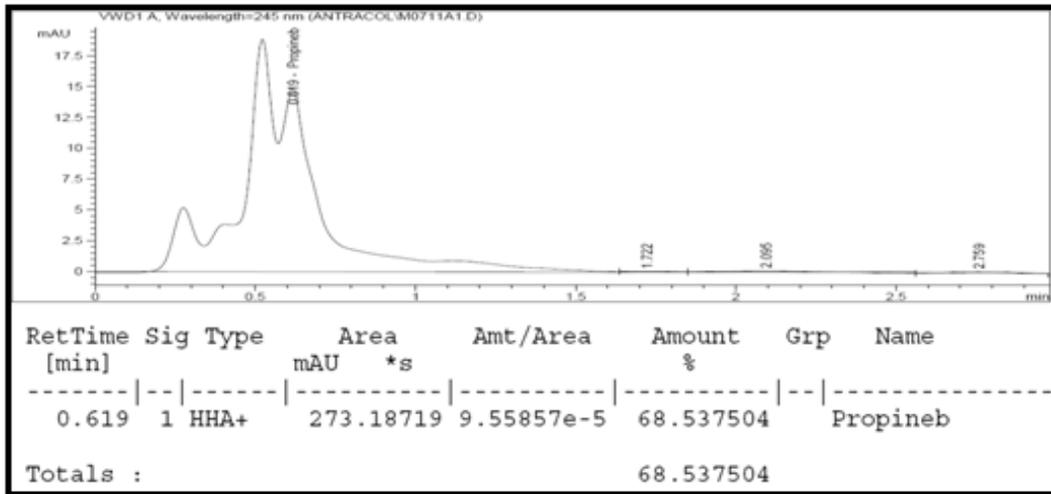
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XX.

Tabla XXII. **Resultados de los parámetros de la validación**

Parámetro	Resultado	Cumple (Si / No)
Exactitud	Media = 69,904233	Si
Precisión	S = 0,966633	Si
Especificidad	-----	Si
Límite de detección	1 ppm	Si
Límite de cuantificación	10 ppm	Si
Linealidad	R = 0,99561	Si
Robustez	CV = 1,382797	Si

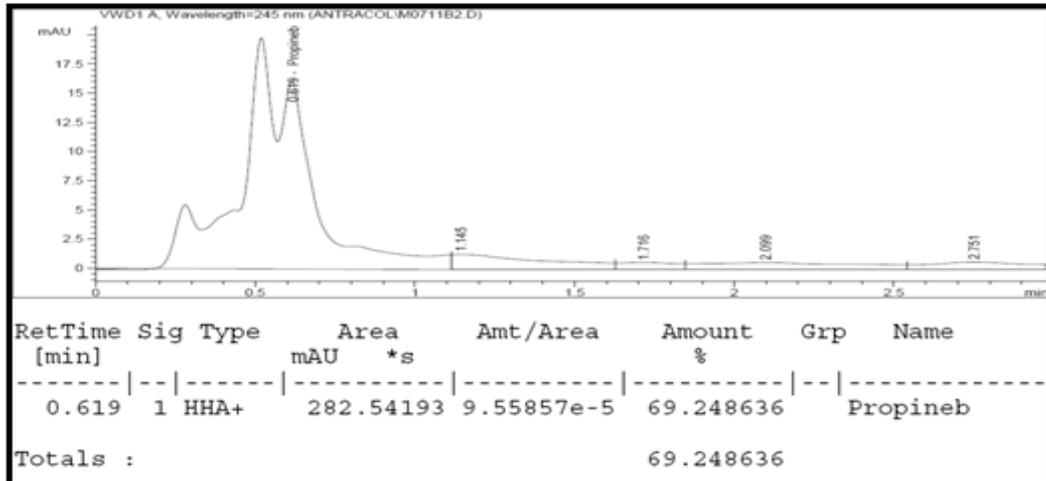
Fuente: elaboración propia con información de la tabla X.

Figura 56. **Cromatograma de la muestra A del Lote 1**



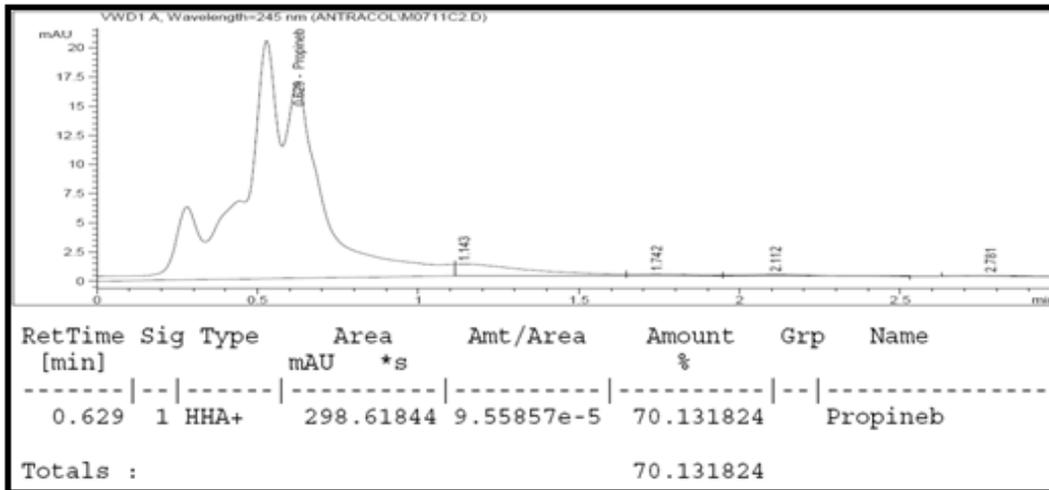
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XX.

Figura 57. **Cromatograma de la muestra B del Lote 1**



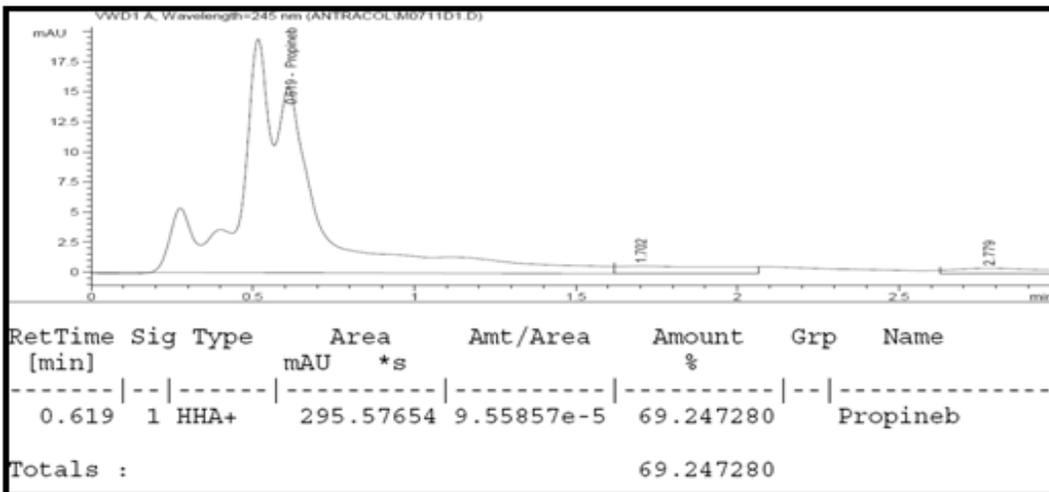
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XX.

Figura 58. Cromatograma de la muestra C del Lote 1



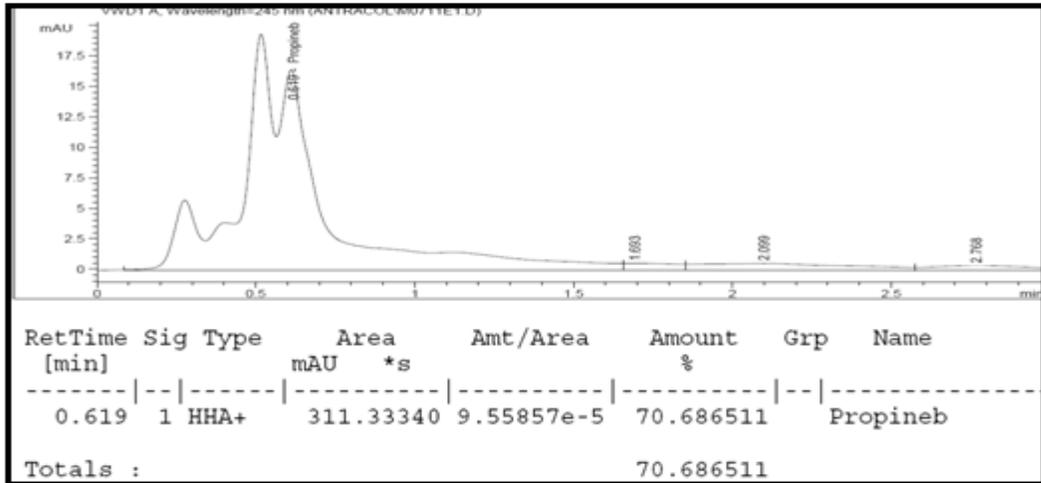
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XX.

Figura 59. Cromatograma de la muestra D del Lote 1



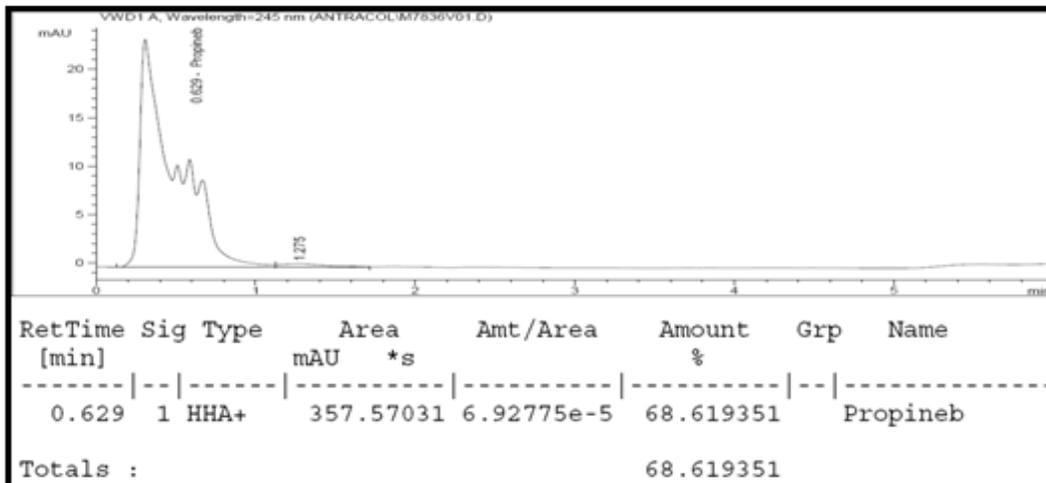
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XX.

Figura 60. **Cromatograma de la muestra E del Lote 1**



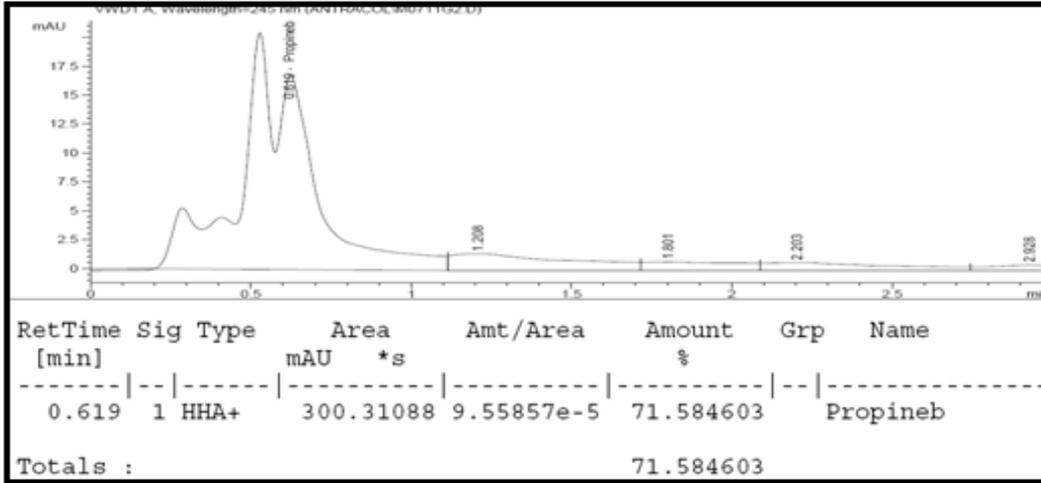
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XX.

Figura 61. **Cromatograma de la muestra A del Lote 2**



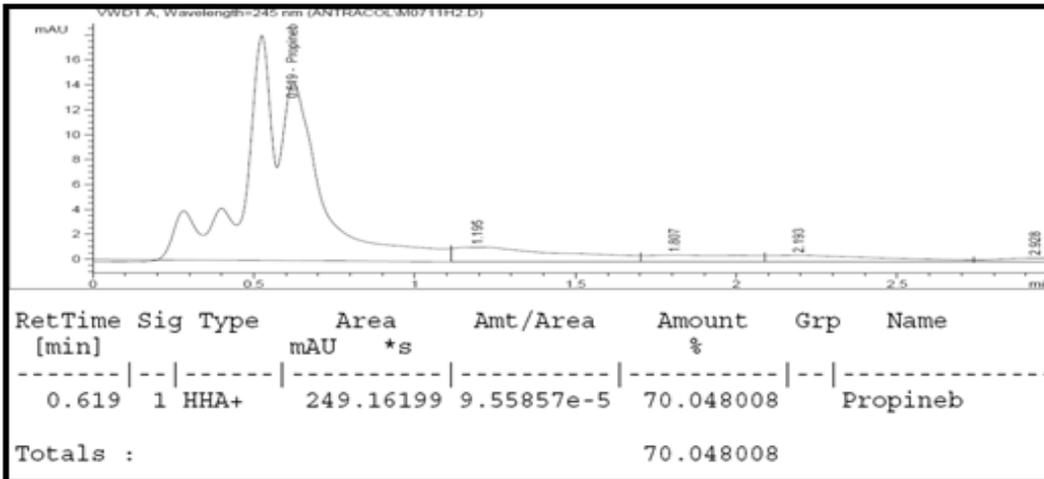
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XX.

Figura 62. Cromatograma de la muestra B del Lote 2



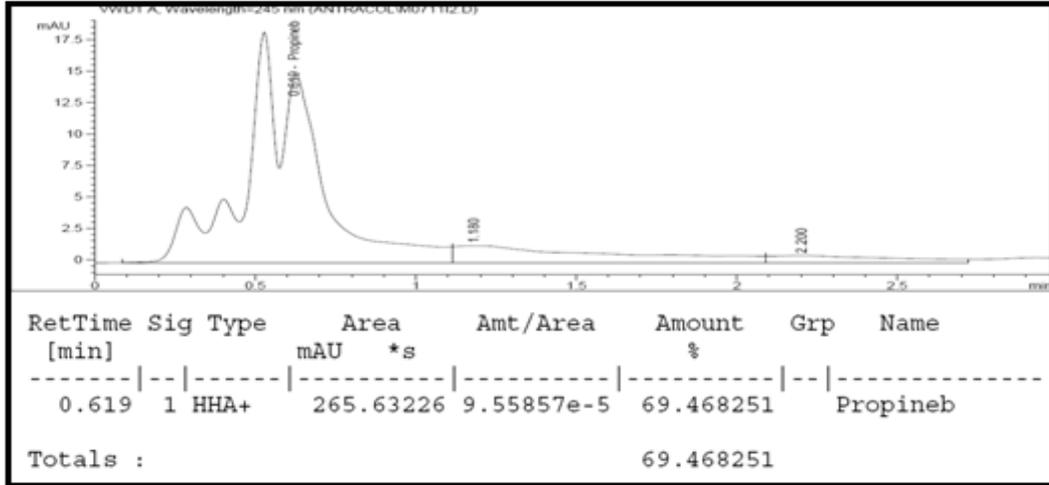
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XX.

Figura 63. Cromatograma de la muestra C del Lote 2



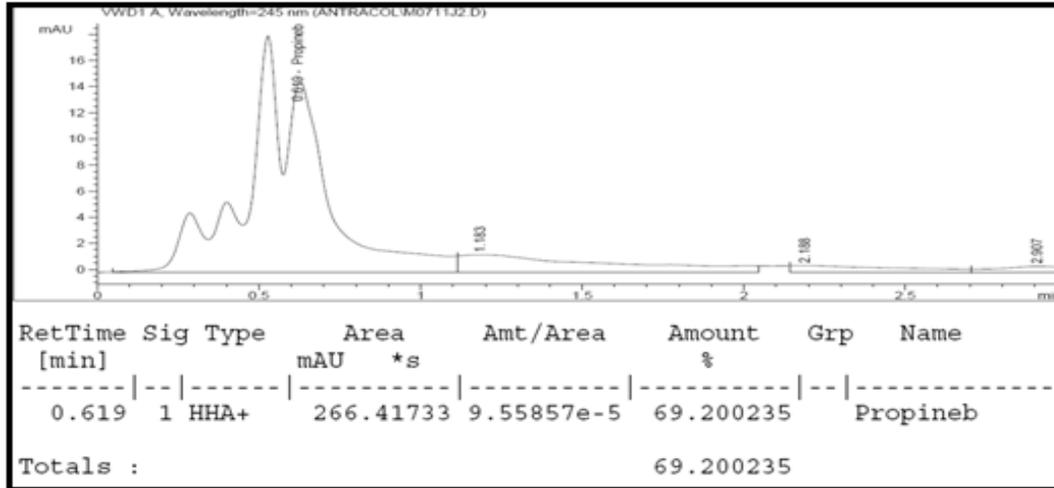
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XX.

Figura 64. **Cromatograma de la muestra D del Lote 2**



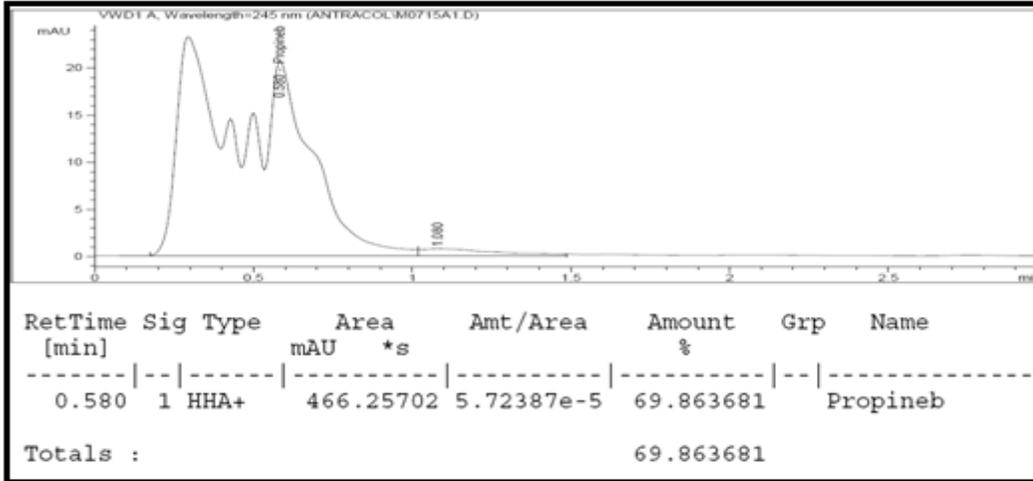
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XX.

Figura 65. **Cromatograma de la muestra E del Lote 2**



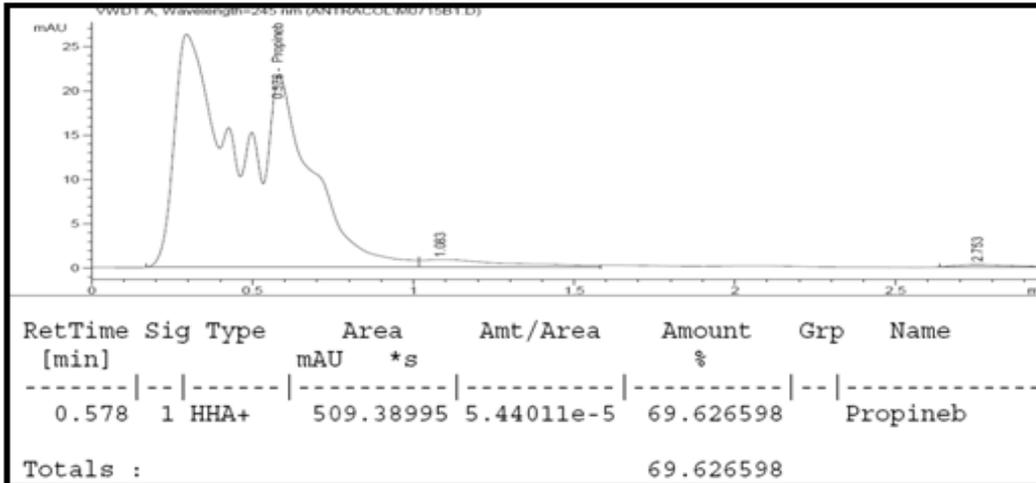
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XX.

Figura 66. Cromatograma de la muestra A del Lote 3



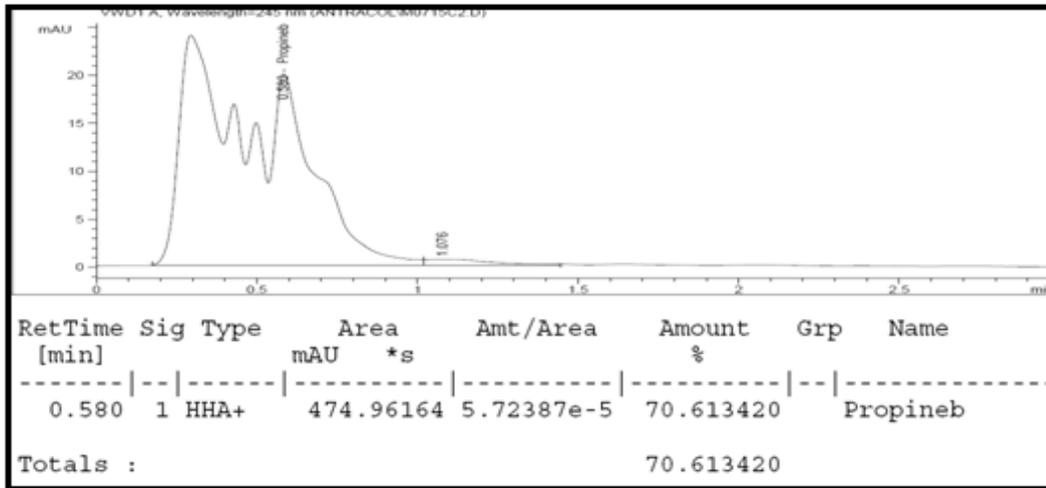
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XX.

Figura 67. Cromatograma de la muestra B del Lote 3



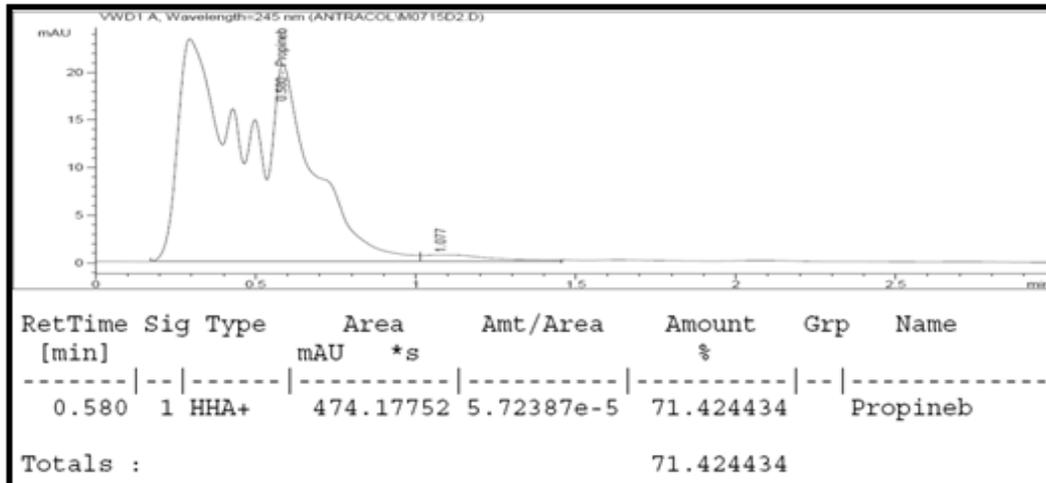
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XX.

Figura 68. **Cromatograma de la muestra C del Lote 3**



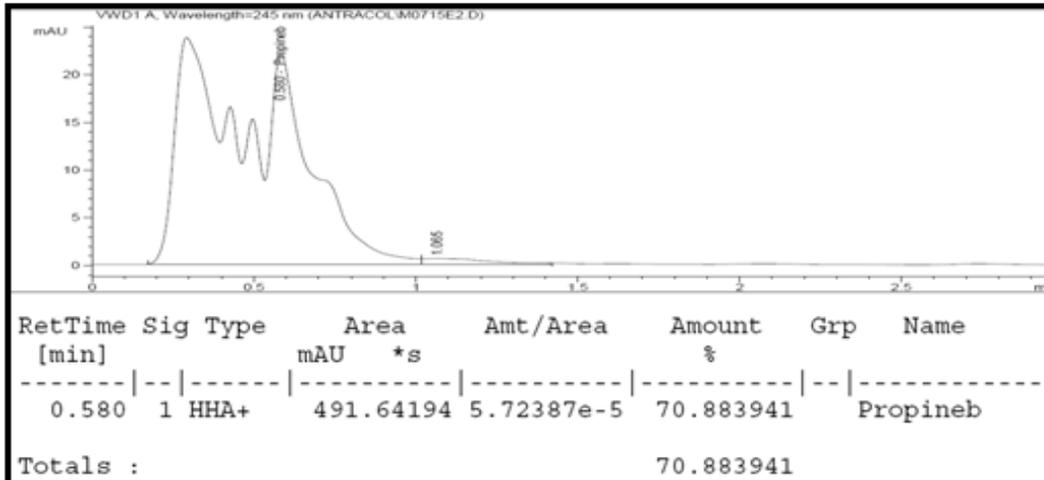
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XX.

Figura 69. **Cromatograma de la muestra D del Lote 3**



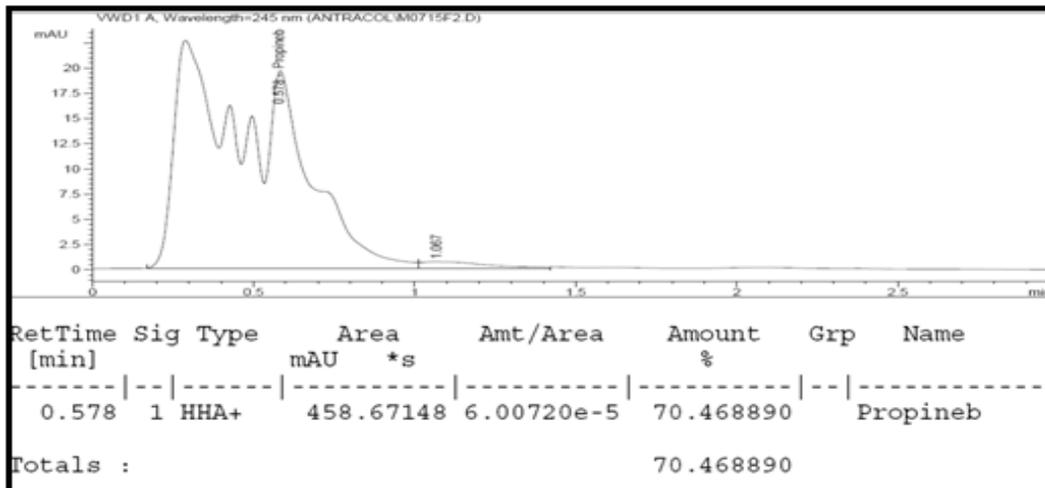
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XX.

Figura 70. Cromatograma de la muestra E del Lote 3



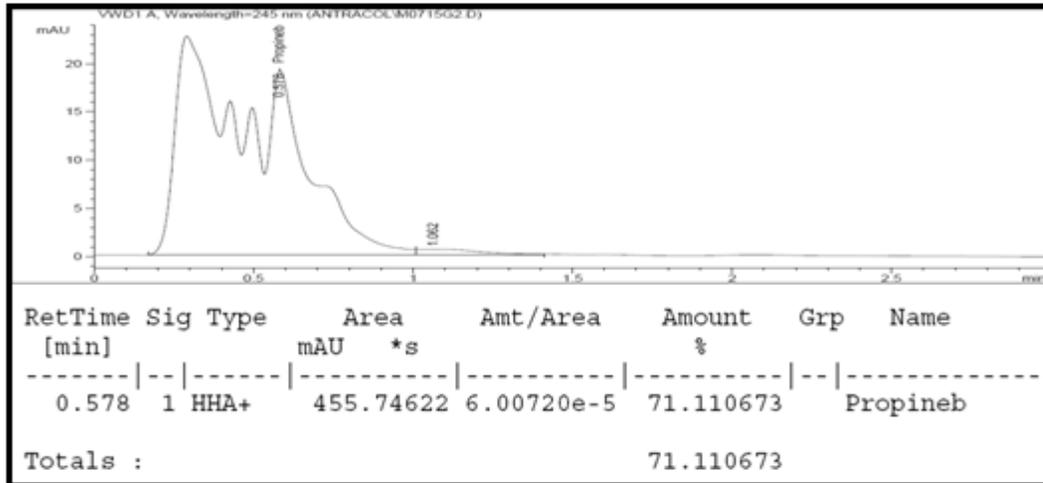
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XX.

Figura 71. Cromatograma de la muestra A del Lote 4



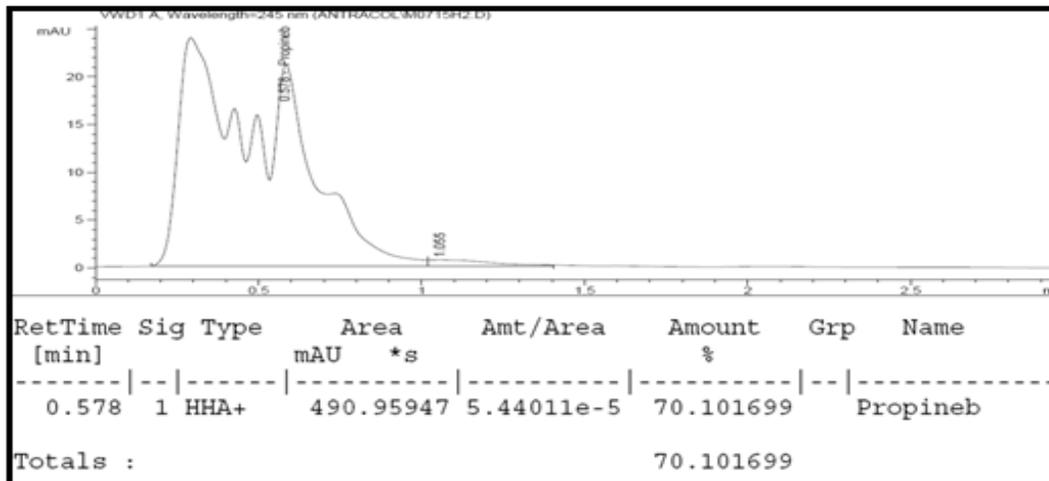
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XX.

Figura 72. **Cromatograma de la muestra B del Lote 4**



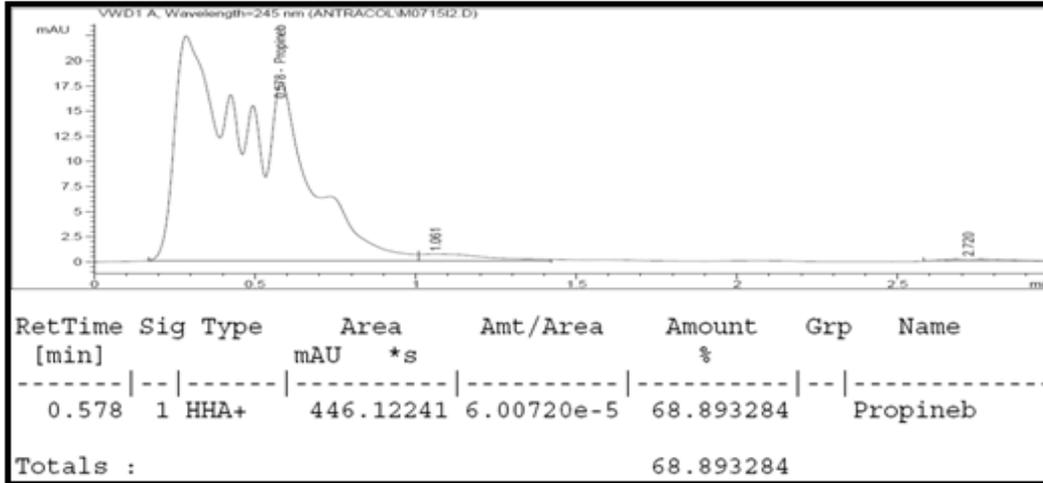
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XX.

Figura 73. **Cromatograma de la muestra C del Lote 4**



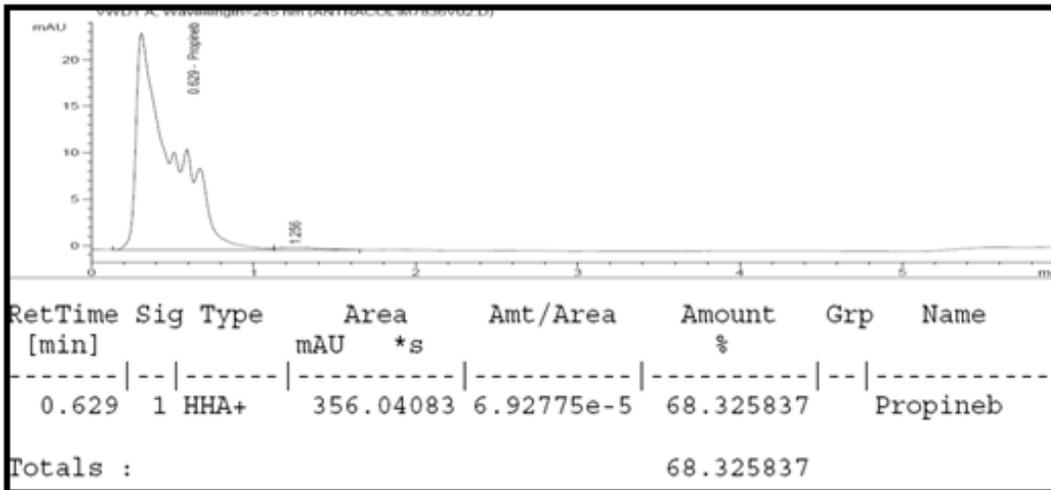
Fuente: elaboración propia con información de la tabla XX.

Figura 74. Cromatograma de la muestra D del Lote 4



Fuente: elaboración propia con información de la tabla XX.

Figura 75. Cromatograma de la muestra E del Lote 4

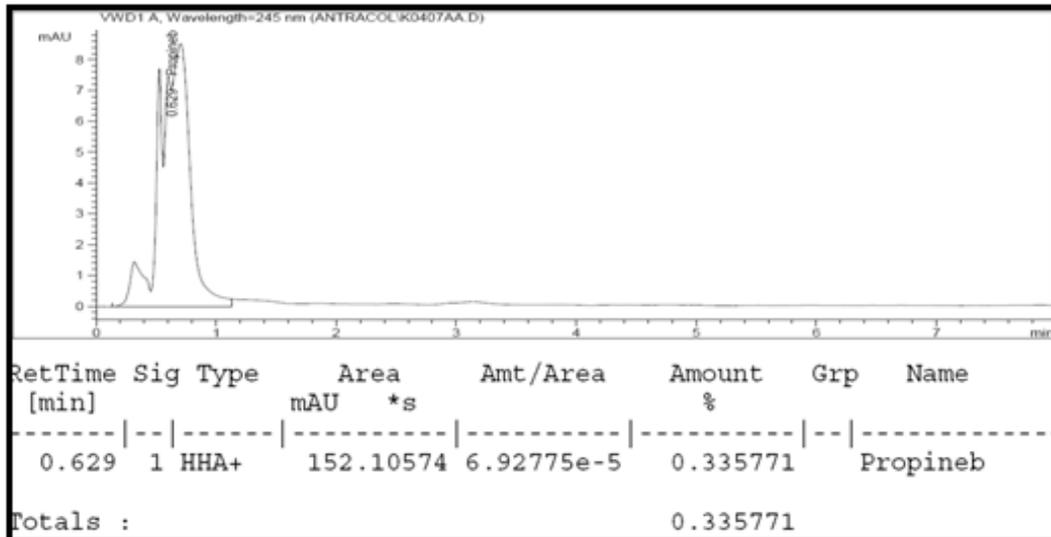


Fuente: elaboración propia con información de la tabla XX.

4.7. Especificidad

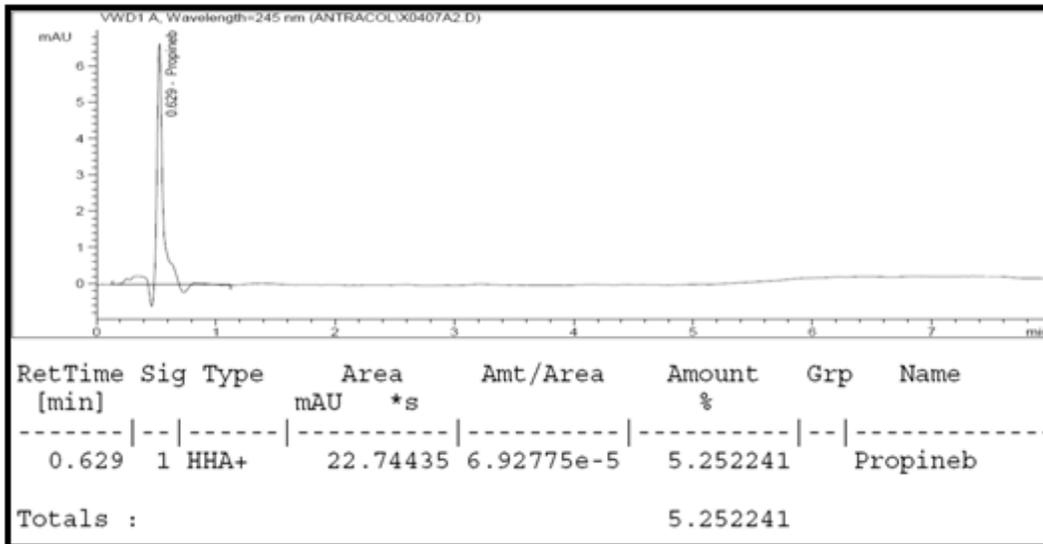
Consiste en determinar los picos para cada uno de los componentes de las muestras de producto final. Se presentan los respectivos cromatogramas de caolín y de la fase de extracción utilizada para el parámetro de especificidad del método propuesto.

Figura 76. Cromatograma del Caolín



Fuente: elaboración propia con información de la tabla XXII.

Figura 77. **Cromatograma de la fase de extracción**



Fuente: elaboración propia con información de la tabla XXII.

4.8. **Comparación de métodos analíticos**

La tabla XXIII muestra los resultados obtenidos de la comparación entre el método volumétrico y el método cromatográfico, en la parte ambiental y de tiempo de respuesta. También se presentan los resultados de una comparación de costos entre ambos métodos y la reducción de los aspectos anteriormente mencionados.

Tabla XXIII. **Comparación entre resultados de análisis cromatográfico y volumétrico de las muestras de Propineb (tiempo de respuesta y desechos)**

Lote	Muestra	Tiempo de respuesta (min)		Desechos (mL)	
		Cromatografía	Volumetría	Cromatografía	Volumetría
1	A	12	20	25	100
	B	12	20	25	50
	C	12	25	25	85
	D	12	20	25	90
	E	12	17	25	100
2	A	12	25	25	95
	B	12	20	25	90
	C	12	17	25	80
	D	12	19	25	85
	E	12	23	25	70
3	A	12	25	25	65
	B	12	25	25	100
	C	12	22	25	75
	D	12	21	25	90
	E	12	24	25	100
4	A	12	23	25	85
	B	12	23	25	90
	C	12	20	25	100
	D	12	20	25	80
	E	12	20	25	95

Fuente: elaboración propia con información de la tabla VIII.

Tabla XXIV. **Comparación de costos para ambos métodos analíticos**

Tipo de Costo		Costo (Q/L)	
		Volumetría	Cromatografía
Reactivos	EDTA	300,00	-----
	Hidróxido de amonio	200,00	-----
	tabletas buffer	1 100,00	-----
	Agua	75,00	75,00
	Acetonitrilo	----	150,00
	Ácido Fosfórico	----	304,00
	Metanol	----	312,40
	Total	1 675,00	841,40

Fuente: elaboración propia con información de la tabla IX.

Tabla XXV. **Porcentajes de reducción entre ambos métodos**

	Volumetría	Cromatografía	Reducción (%)
Tiempo de respuesta de análisis promedio (min)	21,45	12,00	44,06
Costos totales (Q)	1 675,00	841,40	49,77
Desechos totales (mL)	1 770,00	500,00	71,75
Error relativo por método (%)	1,1314286	0,13681	87,91

Fuente: elaboración propia con información de la tabla XI.

Tabla XXVI. **Eficiencia de los métodos analíticos**

	Volumetría	Cromatografía	Aumento eficiencia (%)
Eficiencia (%)	98,87	99,86	1,00

Fuente: elaboración propia con información de la tabla XII.

5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El objetivo del presente trabajo de graduación fue la validación de un método para análisis de Propineb por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para el cumplimiento de las competencias técnicas en un sistema integrado de gestión de calidad, ambiente, salud y seguridad ocupacional.

Para llevar a cabo este objetivo se evaluó el método propuesto, a las condiciones dadas para análisis cromatográfico utilizando los parámetros de validación correspondientes que son: exactitud, precisión, linealidad, especificidad, límite de cuantificación, límite de detección y robustez. Las condiciones del método por cromatografía son:

- Columna: Superspher 100 RP 18
- Longitud de onda: 267 nm
- Temperatura columna: 40 °C
- Fase móvil: H₂O: ACN - 86:14 (%V/V)
- Flujo: 1,5 ml/min
- Volumen de inyección: 10 µL
- Fase de extracción: H₃PO₄: MEOH - 25 : 75 (%V/V)

Posteriormente se compararon el método por cromatografía líquida de alta resolución y el método volumétrico para determinar si el primero podría sustituir al segundo.

Previo a la evaluación de los parámetros de validación se calibró el equipo de análisis utilizando estándares de Propineb. Hecho esto se procedió a determinar la exactitud del método cromatográfico analizando o inyectando 10 veces una muestra de Propineb.

Se obtuvo un 69,904233% en promedio de los análisis, si se asume como valor teórico la concentración de Propineb en las muestras el cual es 70%, el porcentaje de error relativo obtenido es 0,13681%, el cual es menor al 3%, entonces el parámetro de exactitud cumple para la validación del método. Se obtuvo como contenido de la solución 68,23%, en la cual no se rechazó ninguna medición por medio de la prueba de Dixon. Asimismo, se determinó una W de Neuman de 2,288 que permite establecer una tendencia no determinada en las mediciones estudiadas. También se determinó mediante la desviación estándar relativa (0,523) y el límite máximo permisible de Horwitz (1,419) que las mediciones analizadas presentan una variación permisible.

La evaluación de la precisión consistió en analizar o inyectar 10 veces un estándar de Propineb, obtenidos los resultados se procedió a calcular la desviación estándar y esta fue de 0,96663%, la cual es menor al 3%, entonces el parámetro de precisión cumple para la validación del método. Se determinó una W de Neuman de 1,516 que permite establecer una tendencia no determinada en las mediciones estudiadas. Asimismo, se obtuvo como contenido de la solución 99,44%, en la cual no se rechazó ninguna medición por medio de la prueba de Dixon. También se determinó mediante la desviación estándar relativa (0,499) y el límite máximo permisible de Horwitz (1,341) que las mediciones analizadas presentan una variación permisible.

Para la linealidad se analizaron estándares a concentraciones entre 65% y 80%, las cuales se graficaron observando que coincidían en una línea recta, el coeficiente de correlación R es de 0,99561, dado que para cumplir este parámetro $0,99 \leq R \leq 1$ entonces el método es lineal para cualquier muestra que se analice en el intervalo de concentraciones antes mencionado, eso quiere decir, que puede utilizarse este método para cualquier muestra que contenga un contenido de Propineb en la concentración antes mencionada.

La especificidad consistió en inyectar caolín puro y la fase de extracción pura con las condiciones del método de análisis para determinar los picos en el cromatograma y la cantidad que pueden ser detectados de dichos compuestos al analizar una muestra. Se obtuvo un 0,335771% para el caolín y un 5,252241% para la fase de extracción. Es evidente que este parámetro de validación es gráfico.

Los límites de cuantificación y detección se evaluó preparando soluciones de 1 000, 10 y 1 partes por millón, hasta obtener una lectura en la menor concentración posible. Dado esto se obtuvo que el límite de cuantificación es de 10 partes por millón y el límite de detección es de 1 parte por millón.

La robustez se determinó analizando muestras en distintos días y semanas con un mismo estándar, utilizando el método cromatográfico propuesto, para después calcularla utilizando como parámetro estadístico el coeficiente de variación dando como resultado 1,382797%, dado que es menor al 3%, el método cumple con este parámetro.

En la comparación entre métodos se evaluaron el tiempo de respuesta, la cantidad de desechos, la reducción de costos y la eficiencia para verificar si era posible sustituir la volumetría por la cromatografía.

En el tiempo de respuesta se evaluó la duración de análisis de cada muestra, para los diferentes tipos de análisis. En promedio, el tiempo de respuesta por muestra cuando es analizada por cromatografía es de 12 minutos, mientras que para volumetría la duración promedio por muestra fue de 21,45 minutos. Se obtuvo una reducción de 44,06% en tiempo si se analiza por cromatografía en lugar de una titulación.

La cantidad de desechos para la cromatografía fue de 500 mL mientras que para el método volumétrico fue de 1 770 mL del total de muestras analizadas para el estudio. Los desechos se redujeron en un 71,75%.

Para los costos en volumetría y cromatografía se investigaron los precios de los reactivos utilizados en ambos métodos. Para volumetría se gastan aproximadamente Q1 675,00 mientras que para cromatografía el costo llega hasta Q841,40. Dado esto los costos se reducen en un 49,77% aproximadamente.

El método por cromatografía es ligeramente más eficiente que la titulación, donde se obtuvo 99,86% y 98,87% respectivamente. Por lo que el aumento de eficiencia de análisis sólo alcanza el 1%, siendo ambos métodos eficientes para la determinación de Propineb en las muestras de producto.

Para un análisis más detallado se realizó un ANOVA (véase tabla XXI) con este se determinó que existe una diferencia significativa entre los métodos de análisis para Propineb puestos a prueba, por lo que es posible sustituir la titulación por la cromatografía dado que se obtienen resultados más exactos y precisos, es más eficiente, proporciona menor cantidad de desechos y una reducción significativa de tiempo de respuesta de análisis y costos.

CONCLUSIONES

1. El método propuesto de cromatografía líquida de alta resolución para análisis de Propineb cumple con todos los parámetros de validación.
2. Con el método de cromatografía líquida de alta resolución se obtienen resultados más exactos y precisos, es más eficiente que la titulación y proporciona menor cantidad de desechos y una reducción significativa de tiempo de respuesta de análisis y costos, por ello, la cromatografía líquida de alta resolución puede sustituir a la volumetría como método de análisis en muestras de Propineb.
3. Para la precisión del método se determinó una W de Neuman de 1,516 que permite establecer una tendencia no determinada en las mediciones estudiadas. Asimismo, se obtuvo como contenido de la solución 99,44%, en la cual no se rechazó ninguna medición por medio de la prueba de Dixon. También se determinó mediante la desviación estándar relativa (0,499) y el límite máximo permisible de Horwitz (1,341) que las mediciones analizadas presentan una variación permisible.

4. Para la exactitud del método se obtuvo como contenido de la solución 68,23%, en la cual no se rechazó ninguna medición por medio de la prueba de Dixon. Asimismo, se determinó una W de Neuman de 2,288 que permite establecer una tendencia no determinada en las mediciones estudiadas. También se determinó mediante la desviación estándar relativa (0,523) y el límite máximo permisible de Horwitz (1,419) que las mediciones analizadas presentan una variación permisible.
5. Para la linealidad se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,99561, esto define que el método es lineal y que el método propuesto por cromatografía líquida de alta resolución puede ser utilizado para analizar muestras que contengan entre un 65% y 80% de Propineb en las muestras.
6. Los costos se redujeron de Q1 675 a Q841,40 por litro de reactivo utilizado en el estudio.
7. Los desechos se redujeron de 1 770 mililitros a 500 mililitros para un total de 20 muestras analizadas.

RECOMENDACIONES

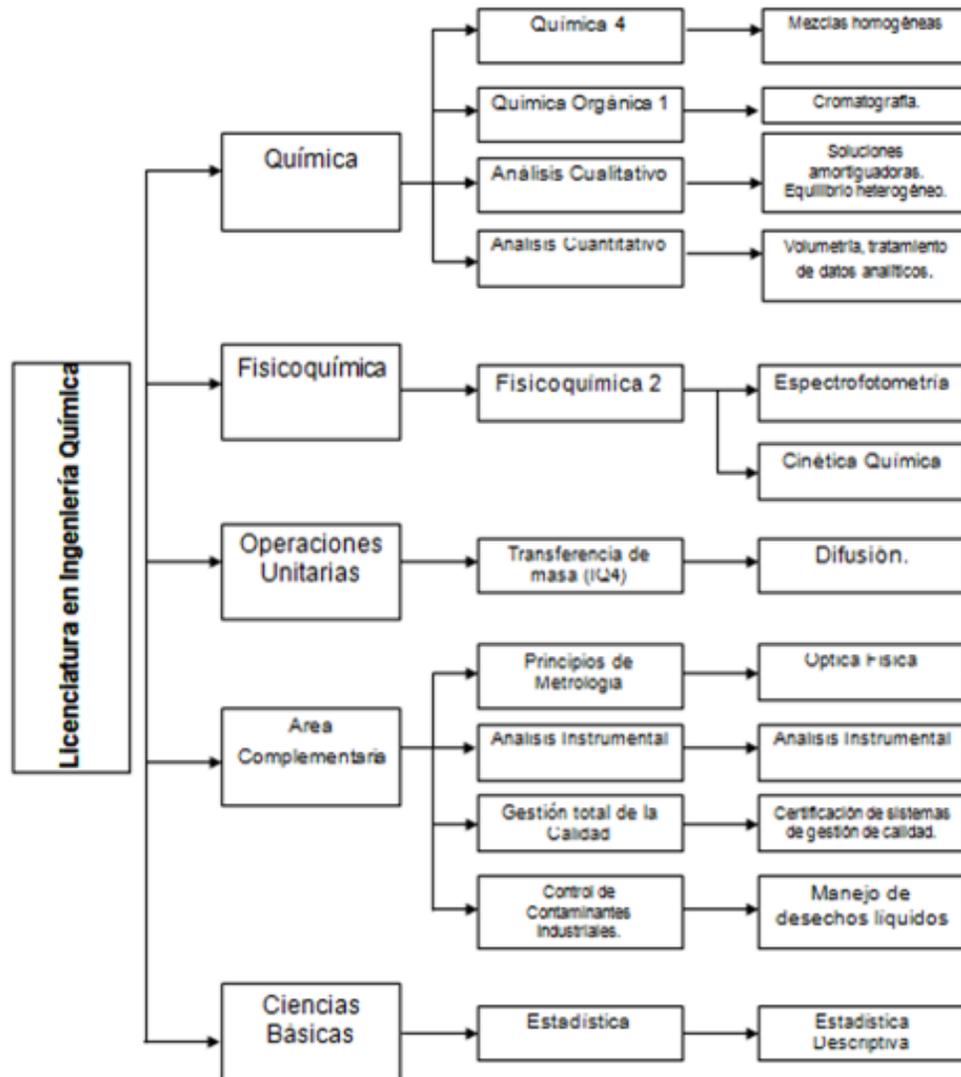
1. Que la columna a utilizar en el análisis de Propineb sea nueva y de uso exclusivo para dicho ingrediente activo.
2. Homogeneizar las muestras utilizando un ultrasonido durante un tiempo moderado (2 - 5 minutos), posterior a esto agitarlas.
3. Utilizar un reactivo alternativo al agua para realizar la limpieza de la columna.
4. Realizar investigación para determinar fases móviles alternas en el método de cromatografía líquida de alta resolución propuesto para análisis de Propineb.

BIBLIOGRAFÍA

1. ISHIKAWA, Kaoru. *¿Qué es el control de calidad? La modalidad japonesa*. Guatemala: Grupo editorial Norma, 1992. 261 p.
2. PARRIS, N.A. *Instrumental liquid chromatography, a practical manual on high-performance liquid chromatographic methods volume - 27*. 2a ed. Estados Unidos: Elsevier, 1985. 447 p. ISBN: 0-444-42061-4.
3. SKOOG, Douglas; LEARY, James. *Análisis Instrumental*. Martín Gómez, María Del Carmen (trad.). 5a ed. España: McGraw-Hill, 2001. 1024 p. ISBN: 0-03-002078-6.

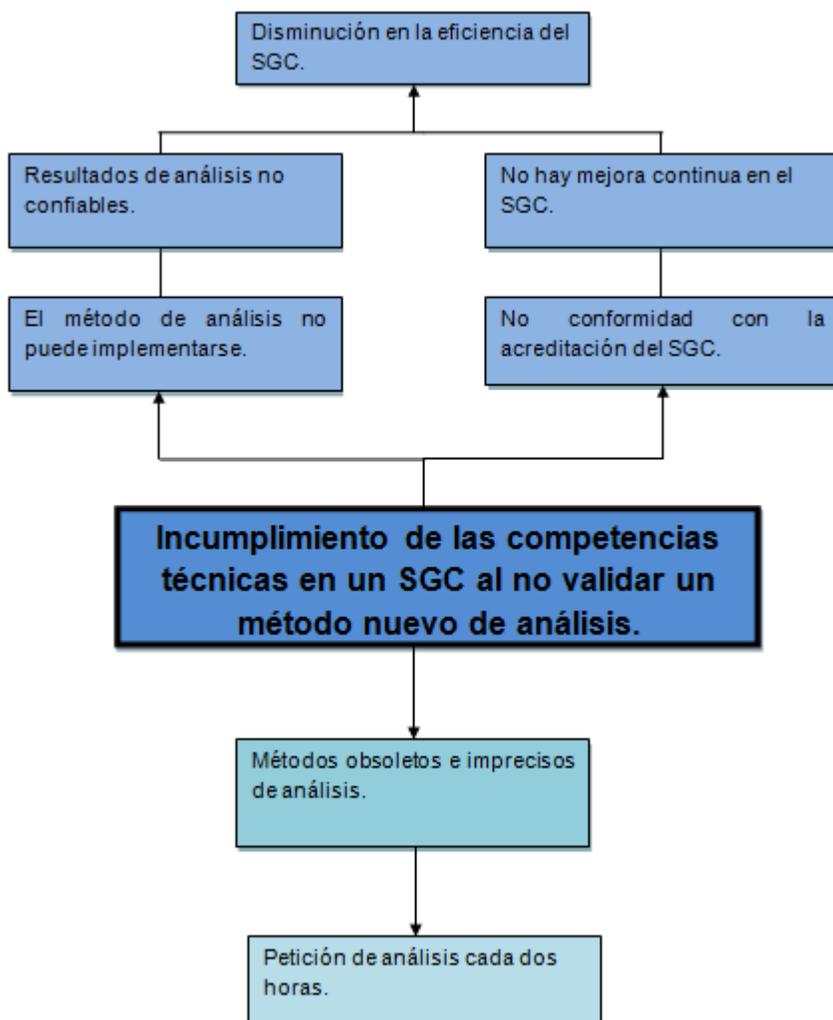
APÉNDICES

Apéndice 1. **Requisitos académicos**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 2. Árbol de problemas



Fuente: elaboración propia.

ANEXO

Anexo 1. **Recolección de información y ampliación de métodos**

- **Prueba Q de Dixon**

Uno de los problemas en el análisis de datos es manejar los valores atípicos dentro de un grupo de datos. Un valor atípico es una observación con un valor que no parece corresponderse con el resto de los valores en el grupo de datos.

Por lo general surgen dos preguntas:

¿Es este valor realmente un valor atípico?

¿Puede eliminarse este valor y continuar con el análisis de datos?

Con respecto a la pregunta 2, debe saberse que las pruebas estadísticas se utilizan para identificar valores atípicos, no para retirarlos del grupo de datos. Técnicamente, una observación no debe retirarse a menos que una investigación halle una causa probable para justificar esta acción.

Si en la investigación no se encuentra una causa probable, debe realizarse un análisis de datos con el valor atípico y sin él. Si las conclusiones son diferentes, entonces se considera que el valor atípico tiene influencia y esto debería indicarse en el informe. Otra opción es utilizar estimadores rigurosos para caracterizar los grupos de datos, tal como la mediana de la muestra en lugar de la media.

La prueba de Dixon utiliza relaciones de las diferencias entre datos que parecen atípicos comparados con los valores del grupo de datos. Esta técnica está diseñada para detectar un único valor atípico en un grupo de datos y por lo tanto no son adecuadas para la detección de múltiples valores atípicos. Este valor se compara con un valor crítico de una tabla y el valor se declara valor atípico si supera ese valor crítico.

Si $D_{\text{calculado}} > D_{\text{tabulado}}$ se rechaza el dato

El valor tabulado depende del tamaño de la muestra, n y de un nivel de confianza elegido, que es el riesgo de rechazar una observación válida. La tabla por lo general, utiliza niveles de baja confianza tal como 1% o 5%. La prueba de Dixon se usa en un número pequeño de observaciones (menor a 26) y detecta elementos que se encuentren sesgados o que son extremos.

Para aplicar la prueba de Dixon se requiere de un número de observaciones igual o mayor a 10. En el caso que las observaciones sean menores a 10 se utiliza como valor esperado el valor de preparación.

Análisis estadístico de los resultados

El principal punto a ser considerado en el tratamiento estadístico de los resultados de un ejercicio de intercomparación es el establecimiento del valor asignado para un determinado analito, que se considera como valor verdadero o valor diana, asumiendo que los resultados obtenidos por los distintos laboratorios siguen una distribución normal y que sus varianzas son iguales para cada nivel.

Este valor es una estimación práctica de la concentración de analito en la matriz y se puede calcular a partir de los resultados obtenidos por los participantes, a partir de los resultados de laboratorios considerados de referencia o considerando la formulación del material analizado.

Previamente a la determinación del valor asignado, es necesaria la detección y eliminación de los resultados discrepantes o anómalos (outliers), por medio de diversos criterios. El test de Cochran se basa en la repetibilidad y elimina los datos de los laboratorios que tienen una varianza intralaboratorio significativamente mayor que la del resto de participantes. El test de Grubbs (simple o doble) sirve para eliminar los laboratorios que obtienen valores medios extremos y que se alejan de la distribución gaussiana de los valores medios de los participantes. Otros métodos son Dixon o Box and Whisker.

La precisión de los resultados informa de la dispersión de los resultados del ejercicio de intercomparación y se determina a partir de las siguientes estimaciones de la varianza:

- Varianza intralaboratorio (within-laboratory): S_w^2
- Varianza de repetibilidad (medidas independientes realizadas con el mismo método de ensayo sobre la misma muestra, en el mismo laboratorio, por el mismo analista y con el mismo equipo, dentro de cortos intervalos de tiempo):

$$S_r^2 = S_w^2 / n$$

- Varianza entre laboratorios (between-laboratory): S_L^2

- Varianza de reproducibilidad (medidas realizadas con el mismo método sobre la misma muestra, en diferentes laboratorios y con diferentes equipos y operadores): $SR_2 = S_{r_2} + S_{L_2}$

El análisis de la varianza (ANOVA)

El análisis de la varianza (ANOVA) es una potente herramienta estadística, de gran utilidad tanto en la industria, para el control de procesos, como en el laboratorio de análisis, para el control de métodos analíticos. Los ejemplos de aplicación son múltiples, pudiéndose agrupar, según el objetivo que persiguen, en dos principalmente: la comparación de múltiples columnas de datos y la estimación de los componentes de variación de un proceso.

Comparación de múltiples poblaciones

La comparación de diversos conjuntos de resultados es habitual en los laboratorios analíticos. Así, por ejemplo, puede interesar comparar diversos métodos de análisis con diferentes características, diversos analistas entre sí, o una serie de laboratorios que analizan una misma muestra con el mismo método (ensayos colaborativos).

También sería el caso cuando se quiere analizar una muestra que ha estado sometida a diferentes tratamientos o ha estado almacenada en diferentes condiciones. En todos estos ejemplos hay dos posibles fuentes de variación: una es el error aleatorio en la medida y la otra es lo que se denomina factor controlado (tipo de método, diferentes condiciones, analista o laboratorio,...).

Una de las herramientas estadísticas más utilizadas que permite la separación de las diversas fuentes de variación es el análisis de la varianza. El ANOVA también puede utilizarse en situaciones donde ambas fuentes de variación son aleatorias. Suponiendo que las muestras de vino se toman aleatoriamente de diferentes partes de un depósito y se realizan diversos análisis replicados. Aparte de la variación natural en la medida se tendrá una variación en la composición del vino de diferentes partes del depósito.

Cuando se tenga un factor, controlado o aleatorio, aparte del error propio de la medida, se habla del ANOVA de un factor. En el caso de que se estuviese desarrollando un nuevo método colorimétrico y se quisiera investigar la influencia de diversos factores independientes sobre la absorbancia, tales como la concentración de reactivo A y la temperatura a la que tiene lugar la reacción, entonces se hablaría de un ANOVA de dos factores. En los casos donde se tienen dos o más factores que influyen, se realizan los experimentos para todas las combinaciones de los factores estudiados, seguido del ANOVA. Se puede deducir entonces si cada uno de los factores o una interacción entre ellos tienen influencia significativa en el resultado.

Para utilizar el ANOVA de forma satisfactoria deben cumplirse tres tipos de hipótesis, aunque se aceptan ligeras desviaciones de las condiciones ideales:

- Cada conjunto de datos debe ser independiente del resto.
- Los resultados obtenidos para cada conjunto deben seguir una distribución normal.

- Las varianzas de cada conjunto de datos no deben diferir de forma significativa.

Coeficiente de Variación de Horwitz (CV_h)

Es el coeficiente de variación definido por W. Horwitz, a través de la ecuación obtenida de un estudio estadístico. En dicho estudio, Horwitz después de reunir una serie de datos (provenientes de 150 ensayos de interlaboratorios organizados por AOAC), observó que el coeficiente de variación de los valores medios dados por los diferentes laboratorios aumentaban a medida que disminuía la concentración del analito.

La ecuación de Horwitz, está definida como:

$$CV_h = 2^{(1-0,5 \cdot \log c)} \quad \text{o} \quad \sigma_H = 0,02 \times c^{0,8495}$$

[Ecuación 1]

Donde:

CV_h = coeficiente de variación de Horwitz

σ_H = desviación estándar calculada conforme al modelo de precisión de Horwitz.

C = concentración del analito expresado en potencia de 10

Este coeficiente de variación (CV_h) está expresado en potencia de 2 y la concentración media del analito expresado como potencia de 10, de esta forma independiente del analito y el método utilizado se puede estimar el CV esperado para la precisión.