

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

*“Evaluación de la robustez de un método analítico para cuantificar
furazolidona por C.L.A.R.”*

Que para obtener el título de:

Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta:

Oscar Omar Paredes Alcántara

México, DF.



2004

TESIS CON
FIRMA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA


Jurado asignado:

Presidente	Prof. <i>Sofía Margarita Rodríguez Alvarado</i>
Vocal	Prof. <i>Ricardo Rodríguez Sáenz</i>
Secretario	Prof. <i>Juan Manuel Rodríguez</i>
1er. Suplente	Prof. <i>Maria de Lourdes Cervantes Ayala</i>
2º. Suplente	Prof. <i>José Manuel Morales Hernández</i>

*Sitio donde se desarrolló el tema:
Facultad de Química
Departamento de Biofarmacia, Laboratorio 113*



Asesor: Juan Manuel Rodríguez



Sustentante: Paredes Alcántara Oscar Omar

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: _____

FECHA: _____

FIRMA: _____

AGRADECIMIENTOS

En esta tesis he plasmado un esfuerzo y conocimiento, esperando haber tenido en todo momento la sabiduría de haber acertado en este objetivo, muestro mi agradecimiento a:

Al departamento de biofarmacia por hacerme sentir como en mi casa, y hacer posible este trabajo, agradeciendo a los maestros, compañeros y amigos por su apoyo, consejos, tiempo y compañerismo.

Al Maestro Juan Manuel por darme la oportunidad de realizar este trabajo y conocer a un grupo de maravillosas personas, también quiero agradecerle por su apoyo, tiempo y consejos, sin olvidar su amistad.

Al Maestro José Manuel que forma parte importante de este trabajo, por su impulso, por su tiempo y aún más por su amistad.

A mi amigo y compañero Jorge que entre corridas y disoluciones se fue formando una invaluable amistad.....gracias "parejita".

A todos los amigos que ahí encontré.

O. Paredes

DEDICATORIA

Leonor y Ramón (mis padres), no encontraría en una vida las palabras que expresan todo lo que significan para mí, pero esta es una forma de agradecerles y mostrar mi amor hacia ustedes.

Edith y Rene (mis hermanitos), por su manera de ser, por su compañía, me han sido de una enorme ayuda, los quiero.

Julio y Jaime (mis amigos), por mostrarme que la amistad es lluvia de flores preciosas.

A mi familia por ser parte importante en mi vida.

A mi querida universidad, por que en ella encontré mucho de lo que da sentido a mi vida.

A mis compañeros y amigos de la escuela, por su tiempo, convivencias, consejos y su amistad han hecho que la universidad sea uno de los momentos más gratos y queridos de mi vida.

A mis maestros, por brindarme sus conocimientos y enseñanzas.

"La vida es un tiempo en el espacio cuyo caminar es un instante siempre muriendo y a su vez constantemente renaciendo, y que cada individuo, cada cosa, cada instante que ella nos ofrece, es una realidad única, incomparable, invaluable, gracias por brindarme ese tesoro"



Oscar Omar

ÍNDICE

Capítulo I (objetivo e introducción)	
Introducción	2
Objetivo	3
Capítulo II (Antecedentes)	
2.1 La cromatografía	5
2.1.1 Clasificación de los métodos cromatográficos	5
2.1.2 Comportamientos de retención	5
2.1.3 Coeficiente de repartición	6
2.1.4 Factor de capacidad	6
2.1.5 Selectividad	7
2.1.6 Altura del plato y número de platos	7
2.1.7 Asimetría de la banda	8
2.1.8 Resolución	8
2.1.9 Cromatografía de líquidos	9
2.1.10 Cromatografía de adsorción	9
2.1.11 Cromatografía con fase enlazada	10
2.1.12 Cromatografía de fase inversa	10
2.1.13 Cromatografía de pares de iones	10
2.1.14 Cromatografía de intercambio iónico	11
2.1.15 Cromatografía de exclusión	11
2.1.16 Cromatografía de afinidad	11
2.1.17 Definición de C.L.A.R.	11
2.1.18 Instrumentación	12
2.2 Validación de métodos analíticos	12
2.2.1 Clasificación de los parámetros de validación	14
2.2.2 Linealidad	14
2.2.3 Exactitud	14
2.2.4 Precisión	15
2.2.5 Límite de detección	15
2.2.6 Límite de cuantificación	15
2.2.7 Especificidad	16
2.3 Robustez	16
2.3.1 Definición de robustez	16
2.3.2 La ventaja de las pruebas de robustez	17
2.3.3 Selección de los factores	17
2.3.4 Selección de los factores en C.L.A.R.	18
2.3.5 Selección de los niveles para los factores	19
2.3.6 Selección del diseño experimental	19
2.3.7 Realización de los experimentos	20
2.3.8 Análisis estadístico de las respuestas e interpretación	21
2.4 El diseño experimental	21
2.4.1 Diseño Factorial 2 ⁿ	23
2.4.2 El análisis de varianza (ANOVA)	25

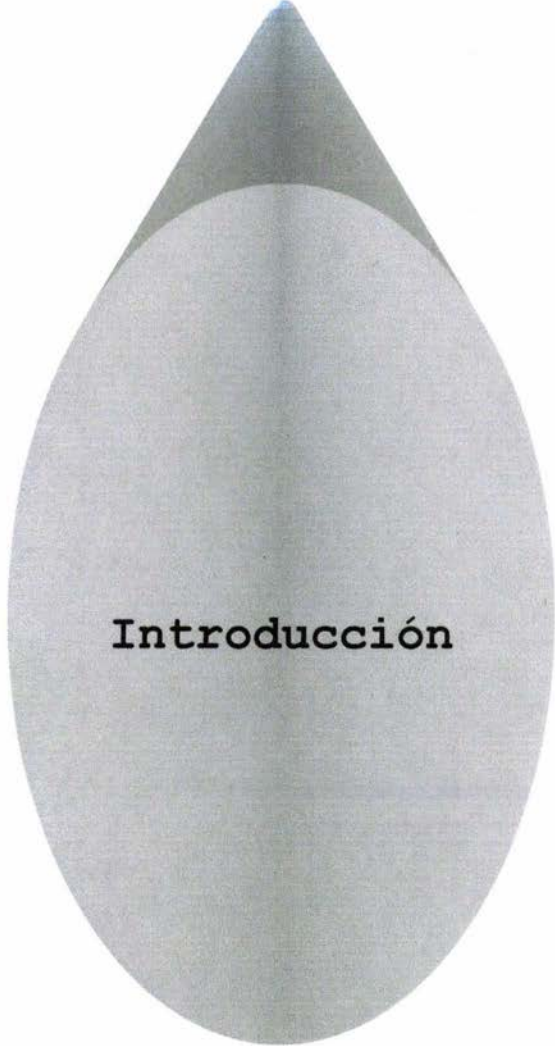
2.4.3	Predicción de la respuesta a partir de una ecuación de regresión	27
2.4.4	Residuales	28
2.5	Furazolidona	29
2.6	Nipagin	29
2.7	Nipasol	30
Capítulo III (Desarrollo experimental)		
3.1	Desarrollo del estudio de Robustez	32
3.1.1	Materiales	33
3.1.2	Equipos	33
3.1.3	Reactivos	34
3.1.4	Columnas	34
3.2	Método Analítico en condiciones normales	35
3.2.1	Soluciones	36
3.2.2	Condiciones cromatográficas	37
3.3	Diseño de experimentos	37
3.3.1	Selección de los factores	38
3.3.2	Selección de los niveles	38
3.3.3	Descripción del diseño experimental	38
3.3.4	Secuencia de los experimentos	39
3.3.5	Ejecución experimental	40
Capítulo IV (Resultados)		
4.1	Resultados	47
4.2	Identificación de parámetros	47
4.3	Condiciones Normales	47
4.4	Nivel A- B+ C+ D-	49
4.5	Nivel A- B+ C- D-	50
4.6	Nivel A+ B+ C+ D-	52
4.7	Nivel A+ B+ C+ D-	53
4.8	Nivel A+ B- C- D	55
4.9	Nivel A- B- C- D-	56
4.10	Nivel A- B+ C- D+	59
4.11	Nivel A- B- C- D+	61
4.12	Nivel A+ B+ C- D+	62
4.13	Nivel A+ B+ C- D-	64
4.14	Nivel A- B- C+ D-	65
4.15	Nivel A+ B+ C+ D+	67
4.16	Nivel A- B+ C+ D+	68
4.17	Nivel A+ B- C+ D+	70
4.18	Nivel A- B- C+ D+	71
Capítulo V (Análisis de Resultados)		
5.1	Ejecución del análisis de resultados	74
5.2	Análisis del factor de capacidad (K'), para la furazolidona	74
5.2.1	Efecto de los factores y las interacciones para K', correspondiente a la furazolidona	75
5.2.2	Análisis de varianza para K', correspondiente a la furazolidona	76
5.2.3	Representación matemática de la relación factores-respuesta para K'	77

5.2.4	Representación gráfica de los modelos para furazolidona, Nipagín y Nípasol (K')	79
5.3	Análisis de número de platos teóricos (N), para la furazolidona	80
5.3.1	Efecto de los factores y las interacciones para N, correspondiente a la furazolidona	80
5.3.2	Análisis de varianza para (N), correspondiente a la furazolidona	82
5.3.3	Representación matemática de la relación factores-respuesta para (N)	83
5.3.4	Representación gráfica de los modelos para furazolidona, Nipagín y Nípasol (N)	85
5.4	Análisis de la simetría (S), para la furazolidona	86
5.4.1	Efecto de los factores y las interacciones para S, correspondiente a la furazolidona	86
5.4.2	Análisis de varianza para (S), correspondiente a la furazolidona	88
5.4.3	Representación matemática de la relación factores-respuesta para (S)	89
5.4.4	Representación gráfica de los modelos para furazolidona, Nipagín y Nípasol (S)	91
5.5	Análisis de correlación del área (r^2), para la furazolidona	92
5.5.1	Efecto de los factores y las interacciones para r^2	92
5.5.2	Análisis de varianza para (r^2), correspondiente a la furazolidona	93
5.5.3	Representación matemática de la relación factores-respuesta para (r^2)	94
5.6	Análisis del tiempo de retención (T_r), para la furazolidona	96
5.6.1	Efecto de los factores y las interacciones para (T_r)	97
5.6.2	Análisis de varianza para (T_r), correspondiente a la furazolidona	98
5.6.3	Representación matemática de la relación factores-respuesta para (T_r)	99
5.7	Análisis del tiempo de análisis (T_a)	101
5.7.1	Efecto de los factores y las interacciones para (T_a)	102
5.7.2	Análisis de varianza para (T_a), correspondiente a la furazolidona	103
5.7.3	Representación matemática de la relación factores-respuesta para (T_a)	104
5.8	Análisis de la resolución entre la furazolidona y Nipagín (R)	106
5.8.1	Efecto de los factores y las interacciones para (R)	107
5.8.2	Análisis de varianza para (R), correspondiente a la furazolidona	108
5.8.3	Representación matemática de la relación factores-respuesta para (R)	109
5.9	Combinación de respuestas	110
Capítulo VI (Conclusiones)		
Conclusiones		113
Capítulo VII (Bibliografía y Anexos)		
7.1	Anexos correspondiente al análisis de respuestas para Nipagín y Nípasol	115
7.2	Análisis del factor de capacidad (K'), para el Nipagín	115
7.2.1	Efecto de los factores y las interacciones (K'), correspondiente al Nipagín	115
7.2.2	Análisis de varianza para (K'), correspondiente al Nipagín	116
7.2.3	Representación Matemática de la relación factores-respuesta para (K')	117
7.3	Análisis del factor de capacidad (K'), para el Nípasol	120
7.3.1	Efecto de los factores y las interacciones (K'), correspondiente al Nípasol	120
7.3.2	Análisis de varianza para (K'), correspondiente al Nípasol	121
7.3.3	Representación Matemática de la relación factores-respuesta para (K')	122
7.4	Análisis del Número de platos teóricos (N), para el Nipagín	125
7.4.1	Efecto de los factores y las interacciones (N), correspondiente al Nipagín	125
7.4.2	Análisis de varianza para (N), correspondiente al Nipagín	127

7.4.3	Representación Matemática de la relación factores-respuesta para (N)	128
7.5	Análisis del número de platos teóricos (N), para el Nípasol	130
7.5.1	Efecto de los factores y las interacciones (N), correspondiente al Nípasol	130
7.5.2	Análisis de varianza para (N), correspondiente el Nípasol	132
7.5.3	Representación Matemática de la relación factores-respuesta para (N)	133
7.6	Análisis de la simetría (S), para el Nipagín	135
7.6.1	Efecto de los factores y las interacciones (S), correspondiente al Nipagín	135
7.6.2	Análisis de varianza para (S), correspondiente al Nipagín	137
7.6.3	Representación Matemática de la relación factores-respuesta para (S)	138
7.7	Análisis de la simetría (N), para el Nípasol	140
7.7.1	Efecto de los factores y las interacciones (S), correspondiente al Nípasol	140
7.7.2	Análisis de varianza para (S), correspondiente el Nípasol	142
7.7.3	Representación Matemática de la relación factores-respuesta para (S)	173
7.8	Bibliografía	145



Capítulo I



Introducción



La utilidad de los métodos analíticos tiene una gran trascendencia, en la industria, investigación, salud o en cualquier otra área. La importancia de tener calidad en los métodos analíticos radica en que los resultados que ellos proporcionen, se tomaran decisiones para aprobar o resolver problemas químicos.

La validación de un método analítico nos asegura la calidad de la misma, además con los parámetros de validación nos brinda información sobre la adecuabilidad, eficiencia y variabilidad, siendo la robustez una medida de la variabilidad del método analítico. Para esto se entiende que la robustez es: "el estudio experimental de la influencia de cambios en las condiciones de operación del método analítico, llamados factores a los cambios, sobre las medidas a evaluar". Las pruebas de robustez identifican los factores en el método que son trascendentales en la respuesta y anticipar los problemas que puedan ocurrir durante la aplicación del método o para la optimización de la técnica, recientemente se ha incrementado la ejecución de estas pruebas en la industria farmacéutica.

Las categorías del diseño del estudio de la robustez involucran cinco pasos:

1. Selección de los factores.
2. Selección de los niveles de los factores.
3. Selección del diseño experimental.
4. Realización de los experimentos.
5. Análisis estadístico de las respuestas e interpretación.

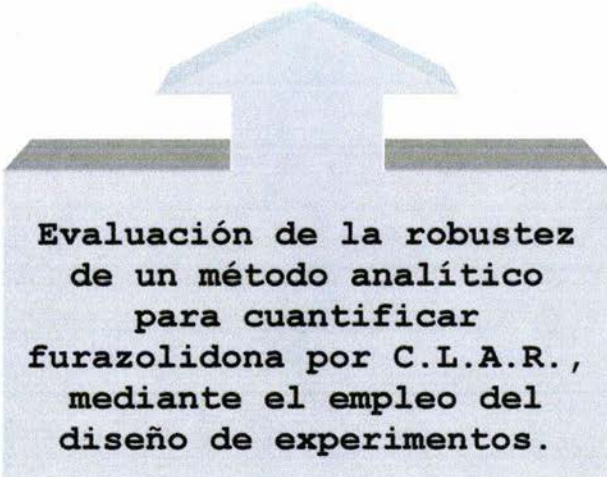
El estudio de la robustez se realizara para la técnica analítica para cuantificar furazolidona (principio activo de una forma farmacéutica), como estudio central del estudio de robustez, así mismo anexando el estudio de robustez del nipagin y nipasol (conservadores de la forma farmacéutica) por HPLC, con respecto a los parámetros de operación de la técnica analítica, se determinara el estudio de los siguientes factores con dos niveles:

Diseño factorial 2⁴		
Factores	Nivel alto	Nivel bajo
<i>Polaridad de la fase móvil</i>	<i>85% fase acuosa</i>	<i>65% fase acuosa</i>
<i>pH de la fase móvil</i>	<i>5</i>	<i>2.5</i>
<i>Longitud de la columna</i>	<i>15 cm</i>	<i>5 cm</i>
<i>Tamaño de partícula</i>	<i>5μm</i>	<i>3.5μm</i>

Mediante el empleo del diseño factorial 2⁴ se realizara el estudio de estos factores sobre las respuestas como son: coeficiente determinación del área, resolución, factor de capacidad, número de platos teóricos, simetría y tiempo de la corrida. Ya que se determinará que factor puro o interacción de factores influyen significativamente sobre las respuestas, así mismo se determinaran las ecuaciones de regresión que relaciona a los factores con la respuesta, dentro del rango de estudio de los factores, mediante estos análisis y otros más se podrá indicar la influencia de los factores sobre la respuesta.



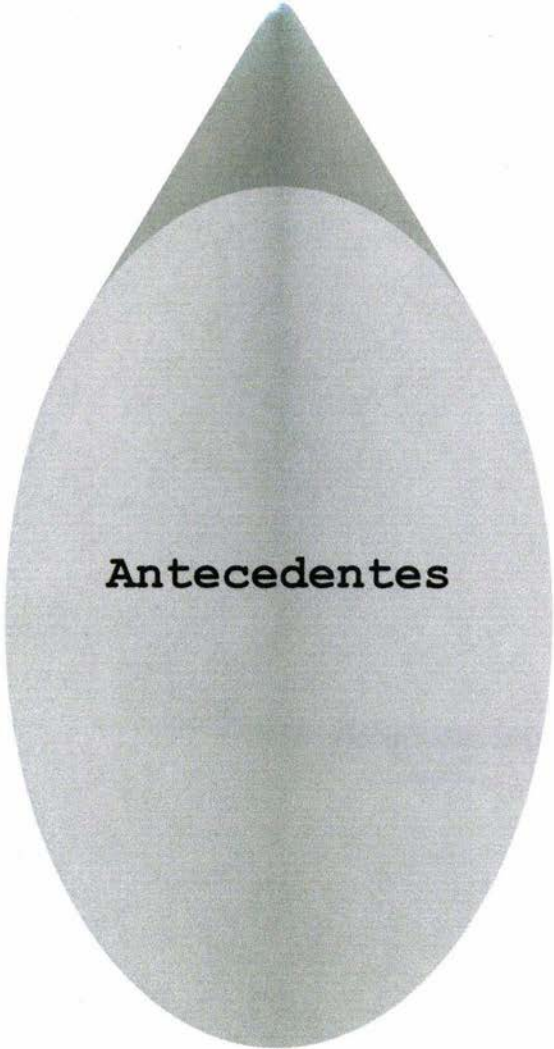
OBJETIVO



Evaluación de la robustez
de un método analítico
para cuantificar
furazolidona por C.L.A.R.,
mediante el empleo del
diseño de experimentos.



Capitulo II



Antecedentes



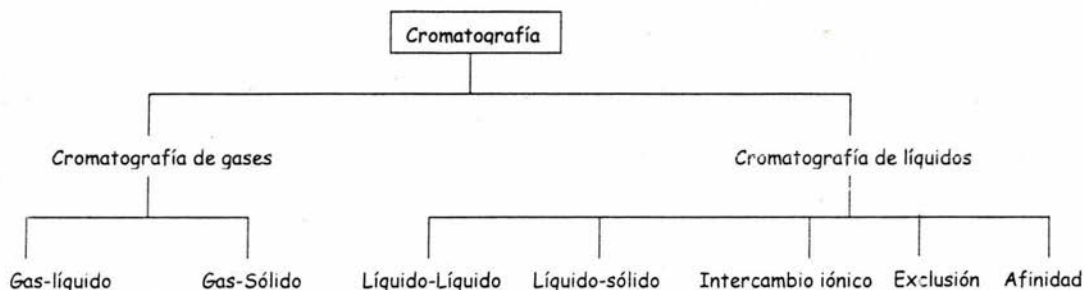
2.1 La cromatografía.

La separación de mezclas en sus respectivos componentes es importante en todas las ramas de la química, el tener una técnica analítica versátil que nos permite resolver un gran número de problemas tiene consigo el desarrollo de otras áreas de la ciencia. Aunque la mayoría de los químicos comprendemos el concepto de este término, es complicado tener una definición para la cromatografía, la definición de Keulemans dice:³

La cromatografía es un método físico de separación, en el cual los componentes que se van a separar se distribuyen entre dos fases; una de estas fases constituye una capa estacionaria de gran área superficial, la otra es un fluido que eluye a través o a lo largo de la fase estacionaria.¹

2.1.1 Clasificación de los métodos cromatográficos.

La característica que distingue a la cromatografía de la mayoría de los métodos físicos y químicos de separación, es que se ponen en contacto dos fases, una es la fase móvil y otra es la fase estacionaria. La muestra que se introduce será transportada a través de la fase estacionaria, de tal manera que el escoger adecuadas fases permite la separación de los componentes que emergen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido y la fase móvil puede ser un líquido o un gas de este modo se puede decir que:²



2.1.2 Comportamientos de retención.

Los comportamientos de retención reflejan la distribución del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria. El volumen de fase móvil necesario para transportar la banda de soluto desde el punto de inyección, a través de la columna, hasta el detector se define como volumen de retención, V_r . Se puede obtener directamente del cromatograma multiplicando el tiempo de retención correspondiente, T_r por el gasto o flujo volumétrico F_c , expresado como el volumen de fase móvil por unidad de tiempo:²



$$V_r = T_r F_c$$

El gasto, en términos de los parámetros de la columna, está dado por:

$$F_c = \frac{\pi d_c^2}{4} \varepsilon_{tot} \frac{L}{T_m} = \frac{V_{col} \varepsilon_{tot}}{T_m}$$

En donde d_c es el calibre de la columna, L corresponde a la longitud de la misma, ε_{tot} es la porosidad total del relleno de la columna y V_{col} es el volumen del lecho de esta última y T_m representa el tiempo muerto. La velocidad lineal promedio, u , de la fase móvil.

$$u = \frac{L}{T_m}$$

Se mide con el tiempo de tránsito de un soluto no retenido, T_m . En cromatografía interactivo ningún material puede eluir antes de este tiempo. Cuando se convierte a volumen, V_m representa lo que se conoce como espacio muerto, volumen de retraso de la columna, el volumen, V_r' , o el tiempo, T_r' , están dados por: ²

$$V_r' = V_r - V_m \quad \text{o bien,} \quad T_r' = T_r - T_m$$

2.1.3 Coeficiente de repartición

Cuando un soluto entra al sistema cromatográfico inmediatamente se reparte o distribuye entre la fase móvil y la estacionaria. Si la fase móvil se para en cualquier momento, el soluto establece un equilibrio de distribución entre las dos fases. La concentración en cada fase está dada por el coeficiente termodinámico de repartición, en donde C_s y C_m son las concentraciones de soluto en la fase estacionaria y móvil, respectivamente.

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

2.1.4 Factor de capacidad

La razón de reparto, K' , es la cantidad más importante en cromatografía en columna. Relaciona el equilibrio de distribución de la muestra dentro de la columna con las propiedades termodinámicas de la columna y con la temperatura, se define como el cociente de los moles de un soluto en la fase estacionaria entre los moles en la fase móvil:



$$K' = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = K \frac{V_s}{V_m}$$

La razón volumétrica de fases, V_m/V_s , se denota usualmente por β . Así, $K' = K/\beta$. Dicho de otra forma el factor de capacidad es el tiempo adicional que una banda de soluto requiere para eluir, en comparación con un soluto no retenido, la relación establece explícitamente cuántos volúmenes muertos se requiere para alcanzar V_r .²

$$K'' = \frac{T_r - T_m}{T_m} = \frac{V_r - V_m}{V_m} \text{ o bien, } T_r = T_m(1 + K')$$

2.1.5 Selectividad

La selectividad α de una columna es una medida de la separación relativa de los picos de los componentes analizados, por ejemplo de dos solutos, donde el soluto 1 eluye antes del soluto 2, y depende de la naturaleza de las fases estacionaria y móvil, así como de la temperatura de operación de la columna, y se define por:²

$$\alpha = \frac{K'_2}{K'_1} = \frac{K_2}{K_1} = \frac{V'_{r2}}{V'_{r1}} = \frac{T_{r2}}{T_{r1}}$$

2.1.6 Altura del plato y número de platos

El número de platos teóricos N de una columna es una medida del número de equilibrios que presenta el soluto dentro de la Columna, estableciéndose el equilibrio entre la fase móvil y la estacionaria, y se define por:²

$$N = \frac{L}{H} = \left(\frac{T_r}{\sigma} \right)^2$$

En donde L es la longitud de la columna, H es la altura del plato, T_r es el tiempo ajustado para la ecuación del centro de la banda y σ es la variancia de la banda en unidades de tiempo. El ancho en la base del pico, W_b , son igual a cuatro veces la desviaciones estándar suponiendo una distribución gaussiana ideal. Así reordenando tenemos que:

$$N = 16 \left(\frac{T_r}{W_b} \right)^2 \text{ o bien, } N = 5.54 \left(\frac{T_r}{W_{1/2}} \right)^2$$

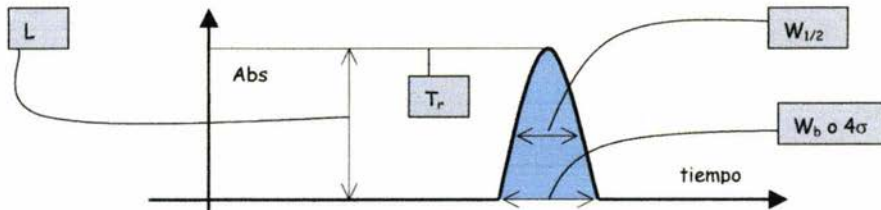


figura 2.1 Se muestra un cromatograma, en donde L corresponde a la longitud del pico, T_r corresponde al tiempo de retención y W el ancho de banda en la base y a media banda.

La altura del plato H, es la distancia que el soluto se mueve mientras se lleva a cabo un reparto, la altura es una buena forma de expresar la eficiencia de la columna en unidades de longitud, sin especificar la longitud de la columna.²

$$H = \frac{L}{N}$$

2.1.7 Asimetría de la banda

El factor de asimetría del pico (AF, de asymetry factor) se define como la razón de las mitades del ancho del pico a una altura dada. Conforme se mida más abajo la asimetría del pico AF es mayor, debido al ruido del detector, un compromiso aceptable es medir AF en 10% de la altura del pico.²

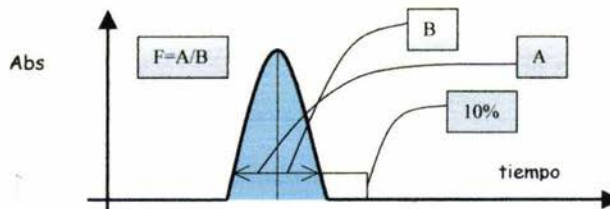


figura 2.2 Se muestra un pico cromatográfico, en donde A y B representa el ancho de banda a una altura del 10%.

2.1.8 Resolución

El grado de separación o resolución de las bandas adyacentes se define como la distancia entre los picos de las bandas dividida entre el ancho promedio de las bandas.

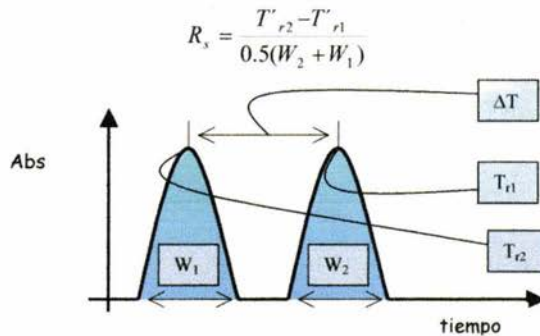


figura 2.3 Se muestra los parámetros para la obtención de la resolución, en donde W representa el ancho de banda, mientras que T_r representa el tiempo de retención.

Cualquier criterio para la resolución sería de algún modo arbitrario. Para una exactitud razonable los máximos de los picos deben estar separados al menos 4σ . Si es así, entonces $R_s=1.0$, que corresponde aproximadamente a un 3% de sobre posición de las áreas de los picos. Un valor de $R_s=1.5$ (para 6σ) representa esencialmente una resolución completa, con sólo 0.2% de sobre posición de las áreas de los picos.²

2.1.9 Cromatografía de líquidos.

Cerca del 80% de todos los compuestos químicos no son lo suficientemente volátiles para la cromatografía de gases, es por eso que la cromatografía de líquidos es potencialmente más importante. Ya que en esta los solutos pueden interaccionar fuertemente con la fase móvil líquida y además la interacción de ésta con la fase estacionaria puede tener un efecto muy pronunciado en la retención, al manipular la fase móvil se obtiene una forma para controlar la retención, lo cual no puede lograr en cromatografía de gases.²

2.1.10 Cromatografía de adsorción.

Si la muestra es soluble en disolventes no polares o moderadamente polares, entonces la cromatografía de adsorción es una buena opción. El mecanismo de la cromatografía de adsorción involucra la interacción entre la molécula y la fase estacionaria, el mecanismo principal en cromatografía de adsorción es la interacción de los grupos hidroxilo del sílice con el grupo funcional polar de una molécula de soluto o del disolvente. Los grupos silanol (Si-OH) ligeramente ácidos del gel de sílice se encuentra en la superficie y se extiende por ella en los canales internos de la estructura del poro.³



2.1.11 Cromatografía con fase enlazada.

Los empaques de columna utilizados más ampliamente para cromatografía de reparto líquido-líquido, son aquellos con fases estacionarias orgánicas enlazadas. Los soportes incluyen geles de sílice de poros grandes, cuencas con lechos porosos y microparticulas, el enlace de tipo siloxano (Si-O-Si-C) se ha convertido en el estándar de las fases enlazadas comerciales, este tipo es estable a la hidrólisis en un intercambio de pH de 2.0 a 8.5. Variando la naturaleza de la porción orgánica del silano enlazado, la superficie del soporte con fase enlazada puede variarse desde una hidrofóbica, que consiste en una capa hidrocarbonácea, hasta una con diversos grupos funcionales colocados en el extremo de afuera de la parte de hidrocarburo.²

2.1.12 Cromatografía de fase inversa.

La cromatografía de fase inversa utiliza un empaque enlazado hidrófobo, usualmente con un grupo funcional octadilo (C-18) u octilo (C-8) y una fase móvil polar, frecuentemente una fase móvil parcial o totalmente acuosa. Conforme aumenta el carácter hidrófobo de los solutos, la retención aumenta. Los hidrocarburos son retenidos más fuertemente que los alcoholes. El metanol y el acetonitrilo son disolventes populares porque tienen baja viscosidad y son fáciles de conseguir. En cromatografía de fase inversa se generan con una disminución continua en la polaridad del eluyente durante la separación y aumentando gradualmente el contenido de disolvente orgánico. El orden de elución comparándolo con la cromatografía de adsorción es inversa, de ahí el nombre de cromatografía de fase inversa.²

2.1.13 Cromatografía de pares de iones.

La cromatografía de pares de iones, que puede considerarse un subconjunto de la cromatografía de fase inversa, puede tratar con especies ionizadas o ionizables en las columnas de fase inversa, en este tipo de cromatografía se añade a la fase móvil un reactivo de par iónico (un contraión orgánico grande) en una concentración baja (normalmente 0.005 M). El reactivo de par iónico se encuentra ionizado por sí mismo. Un ion del reactivo se retiene en la fase estacionaria, normalmente neutra, proporcionándole su carga, esta fase estacionaria cargada por el contra ion puede entonces retener y separar solutos de iones orgánicos de carga opuesta, formando complejos de par iónico reversibles con la muestra ionizada, como se presenta en el equilibrio siguiente:



Aquí se ha supuesto que el ion del soluto sea un anión carboxilato y que el contraión es un ion amonio cuaternario, RN_4^+ . Así, con un contraión adecuado, los compuestos iónicos o ionizables pueden convertirse en compuestos eléctricamente neutros que pueden repartirse entre las fases móviles y estacionaria no polar. La fase estacionaria no habrá perdido nada de su habilidad para retener y separar sustancias orgánicas no ionizadas.²



2.1.14 Cromatografía de intercambio iónico.

La cromatografía de intercambio iónico se lleva a cabo con empaques de columna que tienen grupos funcionales cargados unidos a una matriz polimérica. Los grupos funcionales son grupos enlazados permanentemente y asociados con contraiones de carga opuesta. Existen empaques de intercambio iónico que tienen grupos cargados negativamente y se utilizan para el intercambio con especies catiónicas. Otros diseños para intercambiar especies aniónicas, están provistos de grupos cargados positivamente. Los grupos funcionales utilizados comúnmente son los de tipo sulfonato para intercambio catiónico y los de tipo de amina cuaternaria para el intercambio aniónico. Los intercambiadores sulfonato son fuertemente ácidos y tienen las propiedades de los ácidos fuertes cuando está la forma protonada, los intercambiadores de amonio cuaternario son fuertemente básicos y en su forma OH presentan las propiedades de una base fuerte, así sus propiedades de intercambio son independientes del pH de la fase móvil.²

2.1.15 Cromatografía de exclusión

La cromatografía de exclusión, también llamada cromatografía de permeación en gel, es un modo de separación no interactivo. Es esencialmente un laberinto para las moléculas, las partículas del empaque de la columna tienen varios tamaños y estructuras de poro, de forma que las moléculas son retenidas o excluidas con base en su volumen molecular hidrodinámico; esto es, su tamaño y forma. Conforme la muestra pasa por la columna las moléculas del soluto se ordenan. La cromatografía de exclusión requiere de sólo un disolvente en el que se disuelve y cromatografía la muestra. Puede haber problemas provocados por las viscosidades grandes que presentan las muestras de alto peso molecular. Si la diferencia en la viscosidad entre una muestra inyectada y la fase móvil es muy grande, puede producirse la distorsión del pico y anomalías en los tiempos de elusión.²

2.1.16 Cromatografía de afinidad.

El esquema general de la cromatografía de afinidad involucra la unión covalente de un compuesto químico inmovilizado (llamado ligando de afinidad) a un soporte sólido. Cuando a través de la columna pasa una muestra, sólo se retiene aquellos solutos que selectivamente se unen al ligante complementario, los otros componentes de la muestra eluyen sin retención. Las separaciones explotan la unión de "cerradura y llave" que se presenta en los sistemas biológicos. Los solutos retenidos pueden eluirse de la columna cambiando las condiciones de la fase móvil. La ventaja de esta técnica es su tremenda especificidad, que permite el aislamiento rápido con una recuperación buena en un solo paso.³

2.1.17 Definición de C.L.A.R.

Técnica que realiza la separación física de una mezcla de compuestos a través de la interacción selectiva entre los solutos, una fase estacionaria y una fase móvil, haciendo uso de instrumentación automatizada de alta eficiencia.⁴



2.1.18 Instrumentación.

Muchas compañías venden instrumentos completos para la CLAR; algunos arman sus propios aparatos, en particular cuando tienen necesidades especiales, partiendo de una mezcla de los componentes comerciales con otros fabricantes o en sus propios talleres. Los precios varían mucho, según factores como la presión que proporciona la bomba, si tiene capacidad isocrática o si se pueden programar gradientes de solvente, el tipo y la calidad del detector y la capacidad de computarizar el análisis. Existen muchos aspectos teóricos de los instrumentos que no podemos cubrir en detalle en nuestra breve explicación, a continuación se muestra un diagrama de bloque que muestra los componentes de un instrumento para HPLC.³

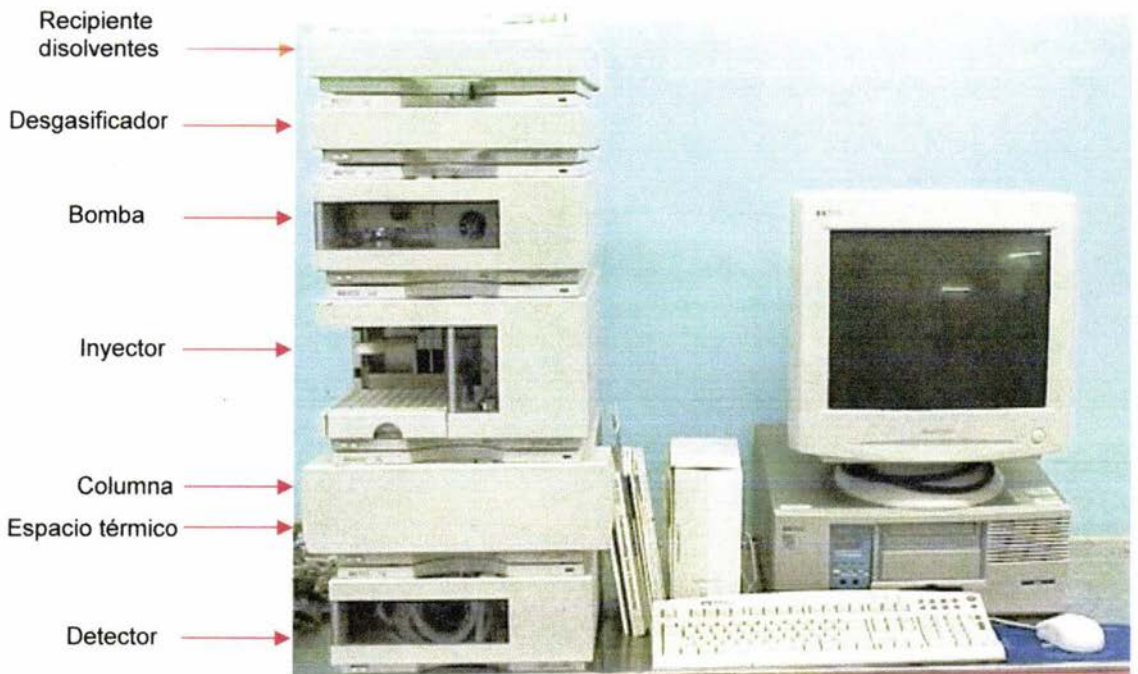


figura 2.4 Cromatógrafo de líquidos Hewlett Packard 1100

2.2 Validación de métodos analíticos.

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se obtiene evidencia documentada por estudios de laboratorio de que las características del comportamiento del método, satisfacen los requerimientos para las aplicaciones analíticas deseadas.⁵



De acuerdo a la USP los requisitos que debe cumplir la validación de un método analítico farmacopeico son: precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, especificidad, intervalo, linealidad y robustez. La información que se requiere para la validación de un método analítico depende de la aplicación deseada y sobre la base de ésta los procedimientos de ensayo se han clasificado en las categorías siguientes:⁵

- Categoría I: Los métodos analíticos para la cuantificación de los principales componentes del fármaco o de los principios activos en productos farmacéuticos terminados.
- Categoría II: Los métodos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos o productos de degradación en el producto farmacéutico, incluyendo ensayos cuantitativos y pruebas de límites.
- Categoría III: Los métodos analíticos para la determinación de las características del comportamiento del producto, como por ejemplo pruebas de disolución, liberación de fármacos, etc.
- Categoría IV: Pruebas de identificación

Al tener estas tres categorías, por consiguiente los parámetros de validación serán distintos entre las categorías, en la siguiente tabla se indican los parámetros que le corresponde a cada categoría.⁵

<i>Validación de métodos analíticos</i>					
<i>Parámetros</i>	<i>Categoría I</i>	<i>Categoría II</i>		<i>Categoría III</i>	<i>Categoría IV</i>
		<i>Cuantitativa</i>	<i>Límite</i>		
Precisión	sí	sí	No	sí	No
Exactitud	sí	sí	Depende prueba	Depende prueba	No
Límite Detección	no	no	sí	Depende prueba	No
Límite Cuantificación	no	sí	no	Depende prueba	No
Especificidad	sí	sí	sí	Depende prueba	Sí
Intervalo	sí	sí	Depende prueba	Depende prueba	No
Linealidad	sí	sí	no	Depende prueba	No
Robustez	sí	sí	sí	sí	no

Tabla 2.1 Se muestra las diferentes categorías y los parámetros que deben cumplir dicha categoría.



2.2.1 Clasificación de los parámetros de validación.

De acuerdo a Hokanson los parámetros de validación se pueden dividir en tres clases, estas basándose en las características que evalúan el comportamiento del método.⁶

1. Parámetros que evalúan la adecuabilidad del método analítico y estos corresponden a los parámetros de especificidad, linealidad, límites de detección y límite de cuantificación.
2. Parámetros que evalúan la efectividad del método analítico y estos corresponden al parámetro de exactitud.
3. Parámetros que involucran aspectos relacionados al método analítico, al proceso de preparación de la muestra y al analista, siendo los parámetros de precisión y robustez.^{6,7}
 - a) analito en la muestra, dentro de un intervalo de concentración establecido.⁷

2.2.2 Linealidad

Es la capacidad del método para asegurar que los resultados analíticos obtenidos directamente o bien mediante una transformación matemática bien definida, sean proporcionales a la concentración de la sustancia de interés dentro de un intervalo de concentraciones establecido, cabe señalar que el proceso de validación del método se debe determinar la linealidad del sistema y del método analítico.⁵

- b) Linealidad del sistema: La determinación de la linealidad del sistema tiene como objetivo demostrar que el método analítico, origina una respuesta lineal de la sustancia de interés dentro de un intervalo de concentración, cuyo punto intermedio se encuentra al 100% de la cantidad a cuantificar por el método de análisis.⁸
- c) Linealidad del método: Los estudios de linealidad demuestran la capacidad del método para proporcionar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, dentro de un intervalo de concentración establecido.⁷

2.2.3 Exactitud

La exactitud es la concordancia absoluta entre el contenido del analito obtenido al aplicar el método a la muestra y el valor verdadero del contenido del analito en la muestra. Generalmente se expresa como el por ciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia de interés.⁹



2.2.4 Precisión

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados individuales obtenidos cuando el procedimiento es aplicado repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea, usualmente se expresa en términos de desviación estándar o desviación estándar relativa. La precisión es una medida del grado de repetibilidad y/o reproducibilidad del método analítico bajo las condiciones de operación establecidas.⁵

- a) Repetibilidad: Es la precisión de un método analítico expresada como concordancia obtenida entre determinaciones independientes, realizadas bajo las mismas condiciones de operación.
- b) Reproducibilidad: Es la precisión de un método analítico expresada como concordancia obtenida entre determinaciones independientes, realizadas bajo condiciones diferentes de operación.⁸

2.2.5 Límite de detección.

Es la mínima concentración de la sustancia de interés presente en una muestra, que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones de operación establecidas. Un estimado del límite de detección es determinado como la respuesta igual a dos veces el nivel de ruido del sistema cromatográfico, generalmente se expresa como un valor umbral de ruido en unidades de concentración.^{5,11}

2.2.6 Límite de cuantificación.

Es la concentración más baja de la sustancia de interés que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas. Un estimado del límite de cuantificación es determinado como cinco veces el límite de detección o como la respuesta igual a diez veces el nivel de ruido del sistema cromatográfico.^{5,10}

2.2.7 Especificidad

Es la capacidad del método analítico para cuantificar exacta y específicamente a la sustancia de interés, en presencia de los componentes que puedan estar presentes en la matriz de la muestra.

La demostración de especificidad muestra su máxima aplicación cuando la técnica propuesta se emplea para determinar el compuesto en estudio de estabilidad. Generalmente se expresa como la interferencia obtenida entre el análisis de muestras adicionadas de productos de degradación, sustancias relacionadas o ingredientes del placebo y el análisis de muestras sin adición de impurezas. La especificidad es una medida del grado de interferencia.^{5,8}



2.3 La Robustez.

La robustez de un método analítico puede describirse como la habilidad de reproducir este método bajo variaciones normales de trabajo, y que los cambios efectuados no afecten drásticamente a la respuesta esperada. Por ejemplo, el tener cambios pronunciados en la respuesta puede tener como consecuencia que se tomen decisiones erróneas sobre la aprobación de un lote en la industria, o aun peor sobre el aspecto clínico de un paciente, como se sabe la prueba de robustez es una parte de la validación de un método analítico, recientemente se ha incrementado su importancia particularmente en la industria farmacéutica, sin embargo las pruebas de robustez no son desarrolladas debido a la complejidad, ya que se ha observado que varios laboratorios tienen problemas en su creación, estructuración experimental y la elucidación de los resultados.^{12, 13, 18}

2.3.1 Definición de Robustez.

Existen dos definiciones de robustez, la primera es una definición frecuentemente utilizada en la literatura química y es:

La prueba de robustez (robustness) es el estudio experimental de la influencia de cambios en las condiciones de operación del método analítico, llamados factores a los cambios, sobre las medidas o las respuestas a evaluar. Los cambios introducidos manifiestan las posibles variaciones que se pueden dar con el método, cuando este es transferido a diferentes laboratorios, diferentes experimentadores, diferentes Instrumentos.^{12, 13}

Los factores que se pueden examinar de acuerdo a esta definición están principalmente relacionados con el método y examinados con la ejecución de un diseño experimental. La segunda definición es menos frecuente en la literatura y es:

La robustez (rogeddness o tolerancia) de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos durante la prueba por el análisis químico de la muestra problema, bajo variaciones de condiciones normales de prueba (no-procedimiento), tales pueden ser: diferentes laboratorios, diferentes analistas, diferentes instrumentos, diferentes lotes, diferentes reactivos, diferentes tiempos de ensayo, diferentes temperatura de ensayo, diferentes días, etc. La robustez es una medida de reproducibilidad de los resultados de la prueba, sometida a cambios inesperados durante la ejecución del método, que se presentan en la transferencia del método analítico. Los factores principalmente analizados en este concepto, no están relacionados con los factores de operación del método analítico y varios de estos factores necesitan ser analizados por un diseño experimental. La principal diferencia entre ambas definiciones es que en la segunda, el procedimiento es ejecutado de acuerdo a la descripción de operación del método analítico, pero ejecutados en diferentes días, diferentes analistas, diferentes reactivos, diferentes lotes, etcétera, mientras que la primera definición de robustez es ejecutada bajo variación de factores relacionados con el procedimiento, mientras que los factores relacionados con el no-procedimiento se mantienen constantes.^{12, 13, 14}



Las categorías del diseño de la robustez involucran cinco pasos:

1. Selección de los factores.
2. Selección de los niveles de los factores.
3. Selección del diseño experimental.
4. Realización de los experimentos.
5. Análisis estadístico de las respuestas e interpretación.

2.3.2 La ventaja de las pruebas de robustez

Las pruebas de robustez identifican los factores en el método que son trascendentales en la respuesta y anticipa los problemas que pueden ocurrir durante la aplicación del método en diferentes instrumentos, diferentes reactivos, etc. La realización de este parámetro de la validación da a conocer aspectos de la precisión y reproducibilidad al ser ejecutado, así como la evaluación de los posibles cambios que se dan al transferirse a otros laboratorios, indicando los rangos de los factores en donde se puede apreciar cambios significativos de la respuesta. Hoy en día es recomendado que la evaluación de la robustez se ejecute durante el desarrollo del método, ya que al tener posibles problemas con el método, este se puede optimizar antes de iniciar de pleno con la validación, usualmente tiene como consecuencia que se utilice mayor consumo de tiempo durante el proceso de validación, pero también aportara un método más confiable.^{12,14}

2.3.3 Selección de los factores.

La selección de los factores del método analítico es un aspecto importante en el diseño de la robustez, ya que para una adecuada distinción de factores a evaluar, el químico debe conocer adecuadamente la técnica analítica, así como el tener referencia bibliográfica del método a evaluar, sin olvidar que el criterio del químico forma un factor clave. La selección correcta de los factores tiene como consecuencia un análisis más profundo de la técnica, en contraparte el químico puede desperdiciar tiempo valioso e inclusive obtener resultados que lo confundan.^{12,13}

El seleccionar un gran número de factores, requiere un largo diseño experimental y un consumo alto de tiempo y por consiguiente un alto costo del desarrollo, cabe señalar que el analizar un gran número de factores no es sinónimo de un adecuado diseño de robustez, la clave esta en seleccionar los factores claves para el diseño experimental.^{12,13}

Los factores a examinar son principalmente seleccionados del procedimiento estándar de operación, y la cantidad dependerá de la aplicación del método, es decir; el método se utilizara internamente, se ejecutara en diferentes sitios, estudios de colaboración o para método oficial, en este orden de aplicaciones, se requiere un mayor número de factores. El número de factores límite recomendado es de ocho, esto por razones prácticas y principalmente por consideraciones de tiempo.^{12,13}



2.3.4 Selección de los factores en CLAR.

Las diferentes técnicas analíticas presentan desiguales principios de operación, por consiguiente diferentes factores, así que dentro de una técnica analítica se pueden encontrar una gran variedad de factores, por ejemplo en la técnica analítica HPLC se pueden obtener hasta 50 factores, de los cuales solo algunos son trascendentales en el diseño de la robustez.¹⁵

El tiempo necesario para el desarrollo experimental de las pruebas de robustez en HPLC, puede tener complicaciones, no solo por el tiempo de corrida de la muestra en el cromatógrafo, ya que también es necesario el tener un tiempo de equilibrio del sistema, después de un cambio en la temperatura, composición de los disolventes, agregando el tiempo para las inyecciones replica. Los principales factores que se analizan para las técnicas analíticas de HPLC, son: Composición de la fase móvil, pH de la fase móvil, concentración de electrolitos, edad de la columna, flujo, temperatura de la columna y tamaño de partícula.^{12, 13} A continuación se muestran tablas con los factores a seleccionar en una técnica analítica de HPLC.¹⁵

<i>Factores a seleccionar para HPLC</i>	
Factores de tratamiento de muestra	Factores medición química
1. Peso de la muestra.	1. El pH de la fase móvil.
2. Concentración de la solución.	2. El pH del buffer.
3. Tiempo de agitación.	3. La fuerza iónica de la fase móvil.
4. Tiempo de sonicación.	4. Concentración del modificador.
5. Temperatura de la muestra.	5. Temperatura de la columna.
6. Volumen de extracción.	6. Volumen de inyección.
7. Tiempo de extracción.	7. Carga de carbono de la columna.
8. Tiempo de centrifugación.	8. Diámetro interno de la columna.
9. Velocidad de centrifugación.	9. Flujo.
10. Concentración del estándar.	10 Longitud de la columna.
11. Relacionados a la derivatización.	11. Uso de la columna.
12. El pH de la solución.	12. Tamaño de partícula.
13. proceso de lavado.	13. Polaridad de la fase móvil.
14. factor de dilución.	14. Polaridad de la fase estacionaria.
15. Proceso de filtración.	15. Relacionados al detector.

Tabla 2.2 Se muestra los factores más comunes del tratamiento de muestra y medición química.



2.3.5 Selección de niveles para los factores

Las variaciones que se le suministran al factor determinaran las posibles diferencias que se encuentre entre los distintos laboratorios, analistas o instrumentos, así mismo variaciones adecuadas cuando se busca una optimización del método analítico. El número de niveles a examinar comúnmente son dos o tres, estos son un valor normal de procedimiento y dos valores extremos, siendo un bajo y el otro alto, esto en el caso de tres factores, mientras que para dos niveles solo aplica los valores extremos.^{12, 13}

La selección del valor del nivel no se establece en donde no es necesario, por consiguiente se establece en donde se tenga un cambio lógico, por ejemplo si consideramos que el tiempo de una reacción es de 30 minutos, al ejecutar la reacción por un analista normalmente no aplicara un tiempo menor a 30 minutos, por consecuente el cambio más lógico es la prolongación del tiempo de reacción, ya que si consideramos que el analista se encuentra ocupado en él termino de la reacción, puede considerar que el prolongar la reacción no la afectara, así que decide detenerla al terminar lo que esta realizando.¹²

Los niveles y los factores proporcionaran información sobre la reproducibilidad así como una gran información adicional, como por ejemplo para la optimización del método, en adición la selección se debe realizar en forma practica, por ejemplo en un procedimiento de operación se tiene concentraciones de Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 . Si definimos dos factores con respecto a las dos concentraciones, se tiene un problema práctico, pero si combinamos esos dos factores y describimos uno nuevo como el pH o la fuerza iónica, el dar esta solución es más conveniente para el análisis de resultados y dentro del procedimiento de operación.^{12, 15}

2.3.6 Selección del diseño experimental

La influencia de los factores es examinada en un diseño de experimentos, la selección esta en función del número de factores a investigar así como del tiempo disponible para la ejecución del diseño de experimentos, la aplicación del diseño permite ejecutar el análisis de un gran número de factores, teniendo un relativo número pequeño de experimentos, así como la necesidad de realizar un análisis estadístico.^{12, 13}

El diseño "diseño factorial" es empleado para un análisis total del diseño, por consiguiente se requiere un número grande de experimentos, en el "Diseño factorial" el número de experimentos se calcula $N=I^n$, en donde n corresponde al número de factores y I al número de niveles. En lo que concierne al diseño "Factorial fraccionado" se considera como una fracción del diseño "Diseño factorial", este diseño consiste en tres fracciones: high-order, second-order y third-order.

La selección de la apropiada fracción depende del número de factores, el número de niveles y el número de experimentos a realizar así como del periodo de tiempo para ejecutar el diseño, pero cabe señalar que el realizar un experimento menos, puede tener como consecuencia que los factores no se investigue correctamente y por lo tanto se confunda la interpretación.



El diseño "Plackett and Burman", este es propuesto para las pruebas de robustez de métodos oficiales, en este diseño el número de experimentos requeridos es igual al número de factores $n + 1$ y multiplicado por cuatro para un diseño de 2 niveles, en adición se puede recurrir a la ayuda de software para la realización del diseño experimental, en el mercado existe una gran variedad de programas de computo, ya que mencionare los comúnmente utilizados por los analistas para ejecutar el diseño, estos son:^{12,13}

- Matlab 4.0
- Statgraphics plus 6.1
- MODDE for windows
- SAS
- Design-Ease v.5
- Design-expert v.5
- Minitab for Window 10.5

2.3.7 Realización de los experimentos

Soluciones: Para la evaluación de los parámetros críticos, se requiere la preparación de los diferentes tipos de soluciones de acuerdo al procedimiento de operación del método, así como las variaciones pertinentes en caso que se evalúen factores en el tratamiento de muestra, tomando en cuenta que la secuencia de inyecciones se realizara de acuerdo al procedimiento.

Inyecciones: La replica de las inyecciones es recomendada excepto si el tiempo es restringido en el diseño a ejecutar.

Orden de experimentos: El orden de los experimentos se realizara en función de la aleatorización de los datos, esto es fundamental en el diseño de experimentos.

Respuestas: Con la realización de los experimentos se determinaran las respuestas, tomando en cuenta que en primera instancia se describirá las respuestas cuantitativas, tales darán información del contenido de la sustancia en el producto, por ejemplo de la técnica analítica HPLC, corresponde a la altura del pico o al área del pico, en segunda instancia se consideran las respuestas cualitativas, en el caso de HPLC nos refiere a la resolución, tiempo de retención, factor de retención, asimetría, entre otras.

Se recomienda la realización de replicas y estas en tiempos regulares de tiempo para la prueba de robustez, ya que normalmente se ha encontrado que la respuesta tiene una tendencia y esta en función del tiempo, así mismo se debe mantener control del resto de los factores no estudiados y el tener toda la ejecución experimental para su posterior análisis.^{12,13,17}



2.3.8 Análisis estadístico de las respuestas e interpretación.

Los resultados de los experimentos son sometidos a un análisis estadístico esto pueden realizarse mediante cálculos o con la ayuda de un software, los resultados de la prueba de robustez deben llevar a la identificación de los factores que tienen efecto significativo sobre la respuesta, esto en la transferencia del método o para la optimización del método analítico. La decisión de indicar que el método es robusto se basa, en mostrar que las respuestas obtenidas de cada experimento cumplen con los requerimientos del método, por ejemplo si el contenido de la sustancia principal de un producto, no se ve afectada por los factores del método, por consiguiente el método analítico se considera robusto para esos factores.^{12, 13, 14, 15, 18, 17, 19}

2.4 El diseño experimental

El diseño experimental es un experimento o serie de pruebas en las cuales se inducen cambios deliberados en las variables de entrada de un proceso o sistema, de manera que sea posible observar e identificar las causas de los cambios en las respuestas de salida. El objeto de estudio puede representarse como una caja negra, en donde suele ser posible visualizar el proceso como una combinación de máquinas, métodos, personas y otros recursos que transforman alguna entrada en una salida que tiene una o más respuestas, algunas de las variables del proceso X_1, X_2, \dots, X_n son controlables, mientras que otras Z_1, Z_2, \dots, Z_n son no controlables. El proceso o sistema bajo estudio puede representarse por medio del modelo de la figura 2.5.

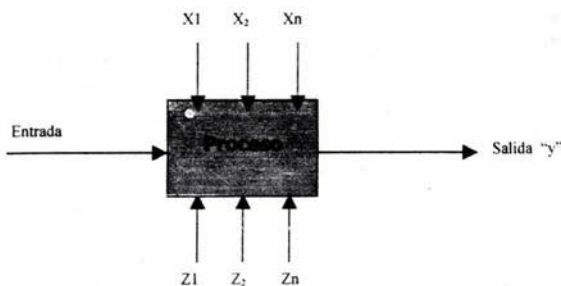


Figura 2.5 Representación de los factores controlables y no controlables en un proceso.

Los métodos del diseño experimental tienen un aspecto importante en el desarrollo de procesos y en la depuración de procesos para mejorar el rendimiento, así como el tener un proceso consistente o robusto, esto es, un proceso afectado mínimamente por fuentes de variabilidad externas. Entre los objetivos del experimento puede incluirse:



- Determinar cuáles variables tienen mayor influencia en la respuesta.
- Determinar el valor de las "x" que influyen en "y", de modo que "y" tenga casi siempre un valor cercano al valor nominal deseado.
- Determinar el mejor valor de las "x" que influyen en "y", de modo que la variabilidad de "y" sea pequeña.
- Determinar el mejor valor de las "x" que influyen en "y", de modo que se minimicen los efectos de las variables no-controlables Z_1, Z_2, \dots, Z_n .

A continuación, se ofrece una guía del procedimiento recomendado.

1. Comprensión y planteamiento del problema. Es necesario desarrollar todas las ideas sobre los objetivos del experimento, es recomendable tomar la opinión de todas las partes implicadas: cuerpo técnico, aseguramiento de calidad, manufactura, división comercial, dirección, clientes y personal operativo, ya que el planteamiento claro del problema contribuye a menudo en forma sustancial a un mejor conocimiento del fenómeno y de la solución final del problema.
2. Elección de factores y niveles. El experimentador debe elegir los factores que varían en el experimento, los intervalos de dicha variación y los niveles específicos a los cuales se hará el experimento. Tal conocimiento suele ser una combinación de experiencia práctica y comprensión teórica.
3. Selección de la variable de respuesta. Al seleccionar la respuesta o variable dependiente, el experimentador debe estar seguro de que la respuesta que se va a medir realmente provea información útil acerca del proceso de estudio.
4. Elección del diseño experimental. Si los tres pasos anteriores se han realizado de la manera correcta, este cuarto paso es relativamente fácil. Para elegir el diseño es necesario considerar el tamaño muestra, seleccionar un orden aleatorio para los ensayos experimentales.
5. Realización del experimento. Cuando se realiza el experimento, es vital vigilar el proceso cuidadosamente para asegurar que todo se haga conforme a lo planeado. En esta fase, los errores en el procedimiento suelen anular la validez experimental.
6. Análisis de datos. Deben emplearse métodos estadísticos para analizar los datos, de modo que los resultados y conclusiones sean objetivos.
7. Conclusiones y recomendaciones. Una vez que han analizado los datos, el experimentador debe extraer conclusiones prácticas de los resultados.^{21, 20}



2.4.1 Diseño factorial 2^k .

Los diseños factoriales detectan la presencia de interacción, y generalmente producirán resultados superiores a los de otros métodos. En general, definimos a un experimento factorial como un experimento en el que cada nivel de un factor se corre en combinación a todos los niveles de los otros factores. En otras palabras, en el experimento se corren todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores.

Ahora daremos un ejemplo simple, supóngase que deseamos correr 4 replicas para un diseño 2^2 , cada una de las $2^2=4$ combinaciones de tratamientos, ya que en este experimento, cada factor tiene dos niveles. En la tabla 2.3 se representa un diseño para este problema, mientras que en la figura 2.6 se muestra la representación grafica. El signo (-) representa el nivel bajo y el (+) el nivel alto.

Tabla 2.3 Representación del diseño factorial.

Factores		Respuestas "y"				Totales
A	b	K1	K2	K3	K4	K1+K2+K3+K4
-	-	18.2	18.9	12.9	14.4	64.4
+	-	27.2	24.0	22.4	22.5	96.1
-	+	15.9	14.5	15.1	14.2	59.7
+	+	41.0	43.9	36.3	39.9	161.1

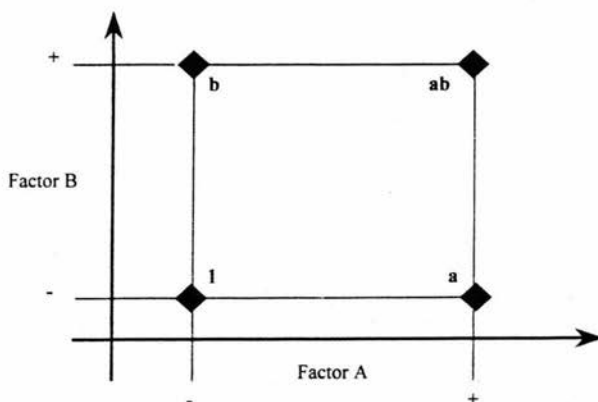


Figura 2.6 -Diseño factorial 2^2



Podemos usar la información de este experimento para estimar los efectos de A, B, y la interacción (AB). Definimos el efecto del factor, como el cambio observado en el nivel promedio de "y", cuando este factor se cambia del nivel bajo al nivel alto. Usando esta definición, vemos que el efecto principal de A sería el nivel promedio de la respuesta "y" para las dos corridas del lado derecho menos el nivel promedio de respuesta de las dos corridas del lado izquierdo del cuadrado. En forma similar, el efecto de B sería el nivel promedio de respuesta "y" para las dos corridas de la parte superior del cuadrado, menos el nivel promedio de respuesta de las dos corridas de la parte baja del cuadrado.

El efecto de las interacciones (AB) se calcula de los promedios de las diagonales. El promedio de la diagonal de derecha a izquierda menos el promedio de la diagonal de izquierda a derecha, es la estimación de la interacción (AB). A continuación se muestra la estimación de los efectos:

$$A = \left(\frac{a+ab}{2n} - \frac{b+1}{2n} \right)$$

$$A = \frac{1}{2n} [a+ab-b-1]$$

$$A = \frac{1}{2(4)} [96.1+161.1-59.7-64.4] = 16.64$$

$$B = \left(\frac{b+ab}{2n} - \frac{a+1}{2n} \right)$$

$$B = \frac{1}{2n} [b+ab-a-1]$$

$$B = \frac{1}{2(4)} [59.7+161.1-96.1-64.4] = 7.54$$

$$AB = \left(\frac{ab+1}{2n} - \frac{a+b}{2n} \right)$$

$$AB = \frac{1}{2n} [ab+1-a-b]$$

$$AB = \frac{1}{2(4)} [161.1+64.4-96.1-59.7] = 8.71$$



La magnitud de estos efectos parece ser grande. Por ejemplo, al cambiar la magnitud del factor A del nivel bajo al nivel alto, se incrementa el nivel promedio de la respuesta "y" por 16.64 unidades. En forma similar, al incrementar la magnitud del factor B del nivel bajo al nivel alto, se incrementa el nivel de respuesta "y" por 7.54 unidades. Mientras que para la interacción AB se observa un valor de 8.71 unidades. El efecto de A es superior al de AB y esta a su vez al de B.^{20, 21}

2.4.2 El análisis de varianza (ANOVA).

Hemos dependido, hasta el momento, de nuestro examen visual de la magnitud de los efectos para interpretar la información. Es posible usar las pruebas estadísticas para determinar cuales efectos son significativos. El análisis de varianza (ANOVA) es un procedimiento estadístico que se usa ampliamente en el análisis de los datos obtenidos en los experimentos diseñados. El análisis de varianza descompone la variabilidad total de los datos, en partes que son relevantes para ese diseño en particular. En nuestro ejemplo, la variabilidad total se dividiría en una parte componente para cada uno de los dos efectos principales A y B, un componente para el ruido o error residual del experimento. Las pruebas estadísticas que usan en el análisis de la varianza dependen de la distribución F.

$$\text{Total} = \frac{A+B}{\text{Efectos principales}} + \frac{AB}{\text{Interacción}} + \frac{\text{ERROR}}{\text{Ruido}}$$

La medida de la variabilidad total que se usa en el análisis es la suma total de los cuadrados de la variabilidad de respuesta "y". Esta suma de cuadrados SC_t se calcula como sigue:

$$SC_t = \sum_{i=1}^a (Y_i - Y_{\text{promedio}})^2$$

No es más que la desviación estándar de "y", en la muestra. Por esto resulta razonable tomar la suma de cuadrados como la variabilidad total de los datos. Mientras lo concerniente a la suma de cuadrados para A, B, y AB. Obsérvese a partir de las ecuaciones que se utilizan para determinar el efecto A, B y AB. Esto es:

$$\text{Contraste}_A = ab + a - b - 1$$

$$\text{Contraste}_B = ab + b - a - 1$$

$$\text{Contraste}_{AB} = ab + 1 - a - b$$



La suma de cuadrados de cualquiera de ellos puede calcularse usando la ecuación:

$$SS_C = \frac{\left(\sum_{i=1}^a C_i Y_i \right)^2}{n \sum_{i=1}^a C_i^2}$$

Esta ecuación establece que la suma de cuadrados de un contraste es igual al contraste elevado al cuadrado entre el producto del número de las observaciones de cada total del contraste por la suma de los cuadrados de los coeficientes del mismo, la suma de los cuadrados de A, B, y AB son:

$$SS_A = \frac{(ab + a - b - 1)^2}{4 * 4}$$

$$SS_B = \frac{(ab + b - a - 1)^2}{4 * 4}$$

$$SS_{AB} = \frac{(ab + 1 - a - b)^2}{4 * 4}$$

La suma de cuadrados del error, se puede calcular en la forma usual, por diferencia, mediante:

$$SS_E = SS_T - SS_A - SS_B - SS_{AB}$$

En nuestro caso:

$$SS_A = 1107.23$$

$$SS_B = 227.26$$

$$SS_{AB} = 303.63$$

$$SS_T = 1709.84$$

$$SS_E = 71.72$$

En general, el número de grados de libertad para un factor será igual al número de niveles de ese factor menos uno. La interacción tiene un grado de libertad también. Generalmente, el número de grados de libertad para una interacción es igual al producto de los grados de libertad para cada uno de los efectos principales que están involucrados en la interacción. Cada celda tiene cuatro observaciones, con tres grados de libertad, por lo tanto para el error es de $4 \times 3 = 12$. La suma de cuadrados para los efectos y el error se dividen entre sus grados de libertad para producir un valor promedio de la suma de cuadrados, llamada suma de cuadrado medio SCM.

El cuadrado medio para la estimación del error estima la varianza del ruido residual de los datos. Si los cuadrados medios para los efectos A, B, y AB son aproximadamente del mismo tamaño que el cuadrado medio del error, entonces esos efectos son pequeños. Cualquier efecto que tenga un cuadrado medio grande con relación al cuadrado medio del error, tiene un efecto no despreciable sobre la respuesta.



Generalmente tomamos el cociente del cuadrado medio para cada efecto entre el cuadrado medio del error, como un estadístico formal, para saber que tan significativo es cada efecto. Ya que podemos ver al cuadrado medio para el error como una medida del ruido residual de la información, esta proporción F puede interpretarse como una proporción de señal a ruido. Los valores grandes de la proporción F implican que el factor tiene una señal fuerte. La magnitud de la proporción F puede interpretarse estadísticamente refiriéndola a una distribución F con un grado de libertad en el numerador y doce grados de libertad en el denominador. En la tabla 2.4, se muestra el análisis de varianza para los datos de nuestro ejemplo.

Fuente	Efecto	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrados Medios	$F = \frac{CM_{efecto}}{CM_{error}}$	Signifs.
A	16.6375	1107.23	1	1107.23	185.25	0.0001
B	7.537501	227.26	1	227.26	38.02	0.0001
AB	8.712501	303.63	1	303.63	50.80	0.0001
Error		71.72	12	5.98		
Total		1709.84				

Las proporciones F del experimento indican que los efectos principales de A y B son grandes, y que también existe una interacción significativa entre los dos factores.^{20, 21}

2.4.3 Predicción de la respuesta a partir de una ecuación de regresión.

También es posible usar esta información para construir una ecuación de regresión para predecir el nivel de respuesta "y" en cualquier magnitud del factor A y B. Los coeficientes de regresión b_0 , b_1 , b_2 , y b_{12} pueden calcularse directamente de las estimaciones de efectos que se obtuvieron previamente.

La interacción b_0 es igual al gran promedio de los 16 puntos. Cada coeficiente de regresión b_1 , b_2 , y b_{12} se encuentra dividiendo la estimación del efecto correspondiente entre 2. La estimación del efecto se divide entre 2 porque el coeficiente de regresión mide el efecto del cambio de una unidad sobre el valor promedio de "y", y las estimaciones de efectos están basadas en un cambio de dos unidades (desde -1 hasta +1).

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_{12} X_1 X_2$$

$$Y = 23.83 + \left(\frac{16.6375}{2}\right)X_1 + \left(\frac{7.5375}{2}\right)X_2 + \left(\frac{8.7115}{2}\right)X_1 X_2$$

En este modelo de regresión, X_1 representa al factor A, X_2 representa al factor B, y $X_1 X_2$ representa a la interacción AB.^{20, 21}



2.4.4 Residuales.

El modelo de regresión puede usarse para calcular un valor predicho en cada uno de los cuatro puntos en el diseño. La diferencia entre los valores observados y los valores predichos, en cada punto, se llaman residuales.

$$e^* = Y_{(Observado)} - Y_{(Predichos)}^*$$

Los residuales pueden usarse para verificar la validez aproximada del procedimiento de análisis de varianza, que hemos usado para analizar nuestros datos, así como para dar información de la variabilidad. Los residuales también pueden usarse para ganar más conocimiento del proceso, tal como señalar observaciones extrañas o en dar más información acerca del efecto que tienen los factores, sobre la variabilidad del proceso de una corrida a otra.

Un residual de magnitud grande fuera de lo común, podría indicarnos que hay un error de registro o análisis de la información, una medición incorrecta, también podría indicar una combinación de condiciones de proceso que originan una respuesta fuera de lo común. En la tabla 2.5 contiene estos residuales junto con las desviaciones estándar de los residuales en los niveles bajos y altos de A, así como de B.

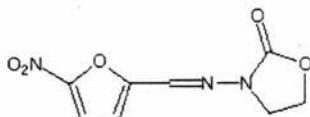
	<i>B (-)</i>		<i>B (+)</i>	
<i>A (-)</i>	2.100 2.800 <i>S(A- B-)=2.91</i>	-3.200 -1.700	0.975 -0.425 <i>S(A- B+)=0.75</i>	0.175 -0.725
<i>A (+)</i>	3.175 -0.025 <i>S(A+ B-)=2.24</i>	-1.625 -1.525	0.725 3.625 <i>S(A+ B+)=3.14</i>	-3.975 -0.375

Cada celda de la tabla contiene la desviación estándar para los cuatro residuales de esa celda. Podemos notar que la desviación estándar de los cuatro residuales en la celda, con A en su nivel bajo y B en su nivel alto, es considerablemente inferior que cualquiera de las otras desviaciones estándar. Esto puede ser indicio de que la variación en los niveles de la respuesta observados es menor cuando el factor A de corte está en el nivel alto. Basándonos en los resultados de nuestro análisis, llegamos a la conclusión de que el nivel promedio de la respuesta "y" se minimiza usando el factor A en el nivel bajo, y que la variación en el nivel de la respuesta de una corrida a otra se minimiza usando el factor B en el nivel alto.^{20, 21}



2.5 Furazolidona

Se presenta en forma de cristales amarillos inodoros casi insolubles en agua y alcohol, ligeramente solubles en cloroformo. Han de protegerse de la luz. La furazolidona es bactericida contra un amplio intervalo de organismos grampositivos y gramnegativos. Pueden darse caso de dolores de cabeza, náuseas, diarreas, erupciones e intolerancia al alcohol. La furazolidona inhibe la monoaminooxidasa y han descrito casos de psicosis tóxica aguda, se ha utilizado para el tratamiento de varias infecciones gastrointestinales, incluyendo fiebre tifoidea y otras salmonelosis y shigelosis.²²



Nombre químico: 3-(5nitrofurfurylideamino)-2-oxazolidone

Formula molecular: $C_8H_7N_3O_5$

Peso molecular: 226.16

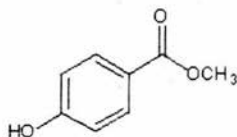
Punto de fusión: 256-257°C

Solubilidad: ligeramente soluble en agua y etanol, poco soluble en cloroformo e insoluble en éter.

Espectro ultravioleta: En solución con DMF y agua se obtiene-259nm, 367nm ($A_1^1=754^\circ$)

Propiedades: Antimicrobiano y Antiparásitario

2.6 Nipagin



Nombre químico: metil-p-hidroxibenzoato

Formula molecular: $C_8H_8O_3$

Peso molecular: 152.15

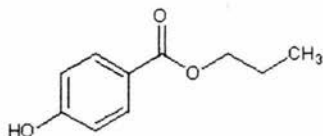
Punto de fusión: 131°C

Solubilidad: Es soluble en agua, alcohol, acetona, glicerol y éter.

Propiedades: Conservador



2.7 Nipasol



Nombre químico: propil-p-hidroxibenzoato

Formula molecular: $C_{10}H_{12}O_3$

Peso molecular: 180.20

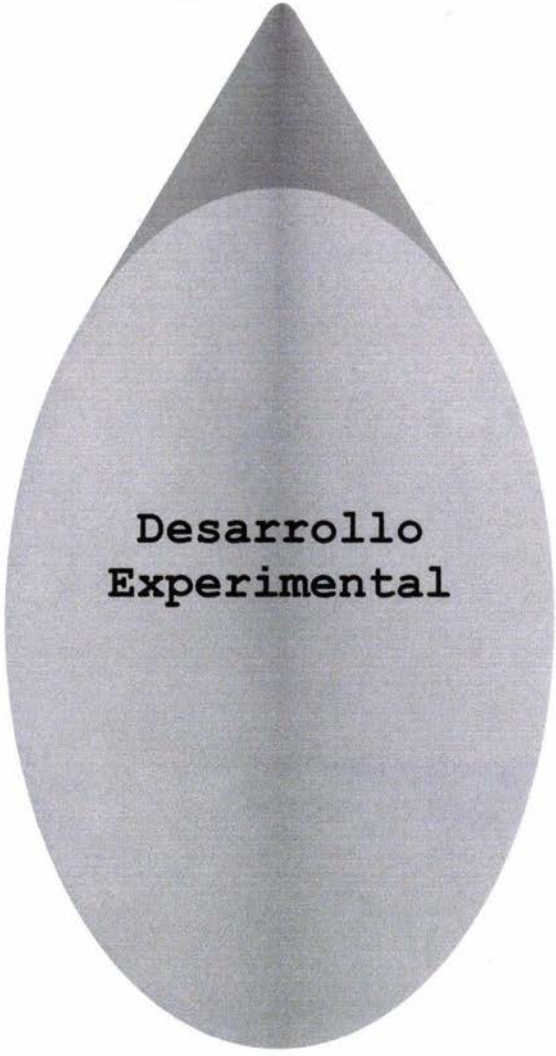
Punto de fusión: 97°C

Solubilidad: Es soluble en agua, alcohol y éter.

Propiedades: Conservador



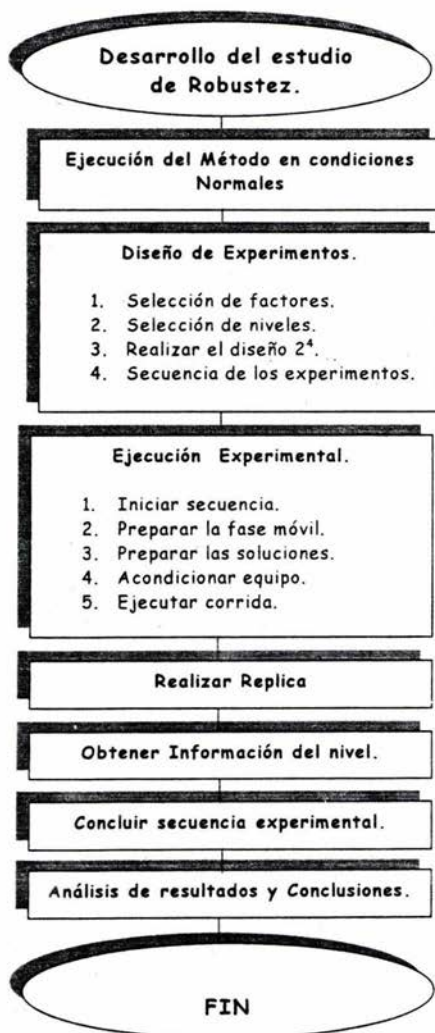
Capitulo III



**Desarrollo
Experimental**



3.1 Desarrollo del estudio de Robustez.





3.1.1 Materiales

Matraces aforados de 100 mL	3
Matraces aforados de 25 mL	6
Matraces aforados de 50 mL	3
Matraces aforados de 250 mL	3
Matraces aforados de 10 mL	15
Matraces aforados de 500 ml	1
Matraces aforados de 1 L	1
Matraces aforados de 2 L	1
Pipeta graduada de 10 mL	1
Pipeta volumétrica de 2 mL	2
Pipeta eppendorf automática de 0.5-5 ml	1
Puntas para pipeta eppendorf de 1-5 ml	3
Pipetas pasteur	25
Propipeta	1
Sistema de filtración Millipore	2
Probeta de 500 mL	1
Probeta de 100 mL	1
Vasos de precipitado de 250 mL	2
Vasos de precipitado de 150 mL	6
Vasos de precipitado de 2 L	2
Viales para automuestreador Hewlett Packard de 1.5 mL	20
Tapas y septas para viales Hewlett Packard	20
Piseta	1
Espátula	1

3.1.2 Equipos

- Vortex Thermolyne.
- Sonicador Branson PC 620, Branson
- Balanza Analítica Ohaus
- Parrilla Nuova II, Thermolyne
- PHmetro, Orion Research
- Sistema cromatográfico Agilents Series 1100
 - Bomba Cuaternaria
 - Desgasificador
 - Automuestreador
 - Detector de longitud de onda variable



3.1.3 Reactivos

Acetonitrilo HPLC Mallinckrodt

Ácido fosfórico, Merck, 1 L, Lote: K325163 314, pureza: 97%

Agua HPLC destilada y desionizada con equipo Milli Q-Waters Syatem

DMF, J.T. Baker, 4 L, Pureza 99.9 %, lote: V15c55

KH_2PO_4 , J. T. Baker, 2.5 Kg, lote: V33C00, Pureza: 99.2%

$\text{H}_2\text{NO}_3\text{SNH}_4$, J. T. Baker, 250 g, lote: N12586

Furazolidona, estándar secundario, 100 mg, potencia: 100%, Humedad: No aplica, lote:0200000020,

Procedencia: Promeco.

Nipagín, estándar secundario, 100 mg, Potencia: 100%, Humedad: No aplica, lote:004A/181655,

procedencia: Promeco.

Nipasol, estándar secundario, 100 mg, Potencia 100%, Humedad: No aplica, lote: 0003A/620461,

procedencia: Promeco.

3.1.4 Columnas

- Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18
 - o C18
 - o Diámetro interno 4.6 mm
 - o Longitud: 150 mm
 - o Tamaño de partícula: 3.5 μm
 - o Forma de la partícula: esférica
 - o Tamaño de poro: 80 Å
 - o Porcentaje de carbono: 10%
 - o Área 180 m^2/g
 - o Temperatura límite: 60 °C
 - o Rango de pH: 2 a 9
 - o End Capped: Doble
 - o Número de serie: USWA002541
 - o Número De parte: 963967902

- Agilent Zorbax Extend-C18
 - o C18
 - o Diámetro interno 4.6 mm
 - o Longitud: 50 mm
 - o Tamaño de partícula: 5 μm
 - o Forma de la partícula: esférica
 - o Tamaño de poro: 80 Å
 - o Porcentaje de carbono: 12.5%
 - o Área 180 m^2/g
 - o Temperatura límite: 60 °C
 - o Rango de pH: 2-11



- End Capped: Triple
- Número de serie: 746450902
- Número De parte: USNS001051

- Merck-C18
 - C18
 - Diámetro interno 3.9 mm
 - Longitud: 150 mm
 - Tamaño de partícula: 4 μm
 - Forma de la partícula: esférica
 - Tamaño de poro: 60 Å
 - Porcentaje de carbono: 7%
 - End Capped: Sí
 - Número de serie: T60301P15
 - Número De parte: 36975

- Waters Spherisorb
 - C18
 - Diámetro interno 4.6 mm
 - Longitud: 50 mm
 - Tamaño de partícula: 3 μm
 - Forma de la partícula: esférica
 - Tamaño de poro: 80 Å
 - Porcentaje de carbono: 11.5 %
 - Area: 200 m^2/g
 - End Capped: Sí
 - Número de serie: 01021172801F03
 - Número de parte: P5563211

3.2 Método Analítico en Condiciones Normales

Método del sistema para cuantificar furazolidona y sus conservadores en suspensión por la técnica analítica Cromatografía de líquidos de alta resolución.

3.2.1 Soluciones

- Fase Móvil: Mezclar 750 mL de solución 13 mM de amidosulfonato de amonio en solución amortiguadora de fosfatos 0.0653 M pH=3 con 250 mL de acetonitrilo HPLC. Filtrar a través de una membrana para fases orgánicas del tipo GVWP de 0.22 μm o equivalente. Desgasificar la fase móvil por ultrasonido y al vacío durante 20 minutos.



- Solución amortiguadora de fosfatos 0.0653 mM pH=3: Pesar con Exactitud aproximadamente 7.96 g de fosfato de potasio monobásico, cristal (KH_2PO_4 , PM 136.09, 99.2%) transferir a un matraz aforado de 1 L, disolver con 500 mL de agua desionizada, agregar ácido fosfórico concentrado (H_3PO_4) para ajustar a pH=3.0. Llevar a volumen con agua desionizada. Filtrar la solución a través de una membrana para solventes acuosos de 0.22 μm o equivalente.
- Solución 13 mM de amidosulfonato de amonio en solución amortiguadora de fosfatos 0.0653 M pH=3.0: Mezclar 1.5 g de amidosulfonato de amonio ($\text{H}_2\text{NSO}_3\text{NH}_4$), PM 114.12) y disolver en 1.0 L de solución amortiguadora de fosfatos 0.0653 M de fosfatos pH=3.0. Filtrar la solución a través de una membrana para solventes acuosos de 0.22 μm o equivalentes.
- Solución de referencia de la furazolidona Pesar con exactitud 10.60 mg y disolver en 5mL de dimetilfomamida y llevar al aforo en un matraz de 100 ml con fase móvil, teniendo una concentración de 106.00 $\mu\text{g/ml}$.
- Solución de referencia del nipasol Pesar con exactitud 20 mg y se disolverá con fase móvil, esto en un matraz de 250 ml que se llevara al aforo, de esta solución se tomaran 2 ml de la solución y se transferirá a un matraz de 25 ml y se llevara al aforo con fase móvil, teniendo una concentración de la solución de 6.40 $\mu\text{g/ml}$.
- Solución de referencia de nipagín Pesar con exactitud 24 mg y se disolverá con fase móvil, esto en un matraz de 25 mL, posteriormente se llevara al aforo con fase móvil, de esta solución se tomaran 2 ml y se transferir a un matraz de 50 mL y se llevar al aforo con fase móvil, teniendo una concentración de la solución de 38.40 $\mu\text{g/mL}$.
- Soluciones problema De cada solución de referencia tomar la alícuota marcada en la tabla y colocar en un matraz de 10 mL (Los tres analitos en el mismo matraz) y aforar con fase móvil.

Nivel %	Alícuota (mL)	Vol. Final (mL)	[Furazolidona] ($\mu\text{g/mL}$)	[Nipagín] ($\mu\text{g/mL}$)	[Nipasol] ($\mu\text{g/mL}$)
50	1.0	10	10.60	3.84	0.64
75	1.5	10	15.90	5.76	0.96
100	2.0	10	21.20	7.68	1.28
125	2.5	10	26.50	9.60	1.60
150	3.0	10	31.80	11.52	1.92

De cada matraz transferir a un vial e inyectar 40 μL bajo las condiciones establecidas



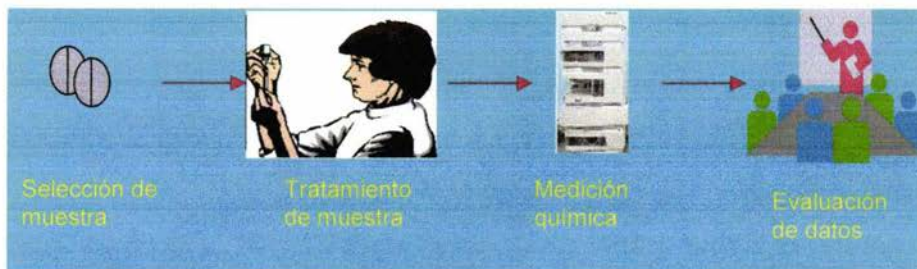
- Replicas Se ejecuto el estudio con tres replicas, con pesadas individuales lo cual involucra la preparación de las soluciones de referencia hasta las soluciones problema.

3.2.2 Condiciones cromatográficas.

- Condiciones cromatográficas
 - Columna: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18
 - Fase móvil: Solución 13 mM de amidosulfonato de amonio en solución amortiguadora de fosfatos 0.0653 M pH=3 al 75 % - con 25 % de acetonitrilo.
 - Flujo: 1.8 ml/min.
 - Temperatura de la columna: Ambiente
 - Volumen de inyección: 40 μ l
 - Longitud de onda 250 nm
 - Presión 254 bar

3.3 Diseño de experimentos

Dentro de un proceso analítico existen cuatro subprocesos, estos son selección de la muestra, tratamiento de la muestra, medición química y análisis de los resultados como se puede apreciar en el diagrama.



La técnica analítica presentada en el punto 3.2 (Condiciones Normales) fue desarrollada para cuantificar furazolidona y sus conservadores, entendiéndose que las pruebas de robustez son el estudio experimental de la influencia de cambios en las condiciones de operación del método analítico, sobre la medida o las respuestas a evaluar, el estudio de esta técnica analítica se enfocara al subproceso medición química.

3.3.1 Selección de los factores

El estudio de la robustez con respecto al subproceso medición, se enfocara sobre los factores polaridad, pH de la fase móvil, longitud de la columna y tamaño de partícula de la columna.



3.3.2 Selección de los niveles

El estudio se realizara con dos niveles, siendo un valor extremo y otro nivel bajo, estos seleccionados sobre la base de las recomendaciones de los tutores, así como de las personas que desarrollaron la técnica analítica, de la comprensión de la técnica analítica, así mismo de la bibliografía, en la siguiente tabla se muestran los factores y sus respectivos niveles.

Diseño factorial 2 ⁴		
Factores	Alto	Bajo
Polaridad de la fase móvil	85% fase acuosa	65% fase acuosa
pH de la fase móvil	5	2.5
Longitud de la columna	15 cm	5 cm
Tamaño de partícula	5 μ m	3.5 μ m

3.3.3 Descripción del diseño experimental

El estudio de la robustez se realizara por un diseño factorial 2 a la 4, con dos niveles, realizando 3 replicas para cada condición establecida para el diseño experimental, a continuación se muestra la tabla con el diseño factorial 2 a la 4.

Diseño factorial 2 a la 4				
Experimento	Polaridad Fase móvil	pH de la fase móvil	Longitud de la Columna	Tamaño de partícula
Número	A	B	C	D
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	-	-
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+



3.3.4 Secuencia de los experimentos

Para la ejecución de la prueba de la robustez es necesario realizar una aleatorización de los experimentos, para la eliminación de factores ajenos al diseño de experimentos, a continuación se muestra una tabla para indicar cual condición se ejecutara primero.

Diseño factorial 2 a la 4				
Orden experimental	Polaridad Fase móvil	pH de la fase móvil	Longitud de la Columna	Tamaño de partícula
Número	A	B	C	D
1	-	+	+	-
2	-	+	-	-
3	+	+	+	-
4	+	-	+	-
5	+	-	-	-
6	-	-	-	-
7	+	-	-	+
8	-	+	-	+
9	-	-	-	+
10	+	+	-	+
11	+	+	-	-
12	-	-	+	-
13	+	+	+	+
14	-	+	+	+
15	+	-	+	-
16	-	-	+	+

Las respuestas a estudiar:

- Número de platos teóricos
- Factor de capacidad
- Resolución
- Simetría.
- Tiempo de retención.
- Tiempo de análisis.
- Factor de determinación del área



3.3.5 Ejecución experimental.

- Experimento 1 correspondiente al nivel A- B+ C+ D-

Condiciones cromatográficas:

- Columna: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18
- Fase móvil: Solución 13 mM de amidosulfonato de amonio en solución amortiguadora de fosfatos 0.0653 M pH=5 al 65 % - con 35 % de acetonitrilo.
- Flujo: 1.8 ml/min.
- Temperatura de la columna: Ambiente
- Volumen de inyección: 40 μ l
- Longitud de onda 250 nm
- Presión 251 bar

- Experimento 2 correspondiente al nivel A- B+ C- D-

Condiciones cromatográficas:

- Columna: Waters Spherisorb C18
- Fase móvil: Solución 13 mM de amidosulfonato de amonio en solución amortiguadora de fosfatos 0.0653 M pH=5 al 65 % - con 35 % de acetonitrilo.
- Flujo: 1.8 ml/min.
- Temperatura de la columna: Ambiente
- Volumen de inyección: 40 μ l
- Longitud de onda 250 nm
- Presión 145 bar

- Experimento 3 correspondiente al nivel A+ B+ C+ D-

Condiciones cromatográficas:

- Columna: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18
- Fase móvil: Solución 13 mM de amidosulfonato de amonio en solución amortiguadora de fosfatos 0.0653 M pH=5.0 al 85 % - con 15 % de acetonitrilo.
- Flujo: 1.8 ml/min.
- Temperatura de la columna: Ambiente
- Volumen de inyección: 40 μ l
- Longitud de onda 250 nm
- Presión 220 bar



- Experimento 4 correspondiente al nivel A+ B- C+ D-

Condiciones cromatográficas

- Columna: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18
- Fase móvil: Solución 13 mM de amidosulfonato de amonio en solución amortiguadora de fosfatos 0.0653 M pH=2.5 al 85 % - con 15 % de acetonitrilo.
- Flujo: 1.8 ml/min.
- Temperatura de la columna: Ambiente
- Volumen de inyección: 40 μ l
- Longitud de onda 250 nm
- Presión 224 bar

- Experimento 5 correspondiente al nivel A+ B- C- D-

Condiciones cromatográficas

- Columna: Waters Spherisorb C18
- Fase móvil: Solución 13 mM de amidosulfonato de amonio en solución amortiguadora de fosfatos 0.0653 M pH=2.5 al 65 % - con 35 % de acetonitrilo.
- Flujo: 1.8 ml/min.
- Temperatura de la columna: Ambiente
- Volumen de inyección: 40 μ l
- Longitud de onda 250 nm
- Presión 135 bar

- Experimento 6 correspondiente al nivel A- B- C- D-

Condiciones cromatográficas

- Columna: Waters Spherisorb C18
- Fase móvil: Solución 13 mM de amidosulfonato de amonio en solución amortiguadora de fosfatos 0.0653 M pH=2.5 al 65 % - con 35 % de acetonitrilo.
- Flujo: 1.8 ml/min.
- Temperatura de la columna: Ambiente
- Volumen de inyección: 40 μ l
- Longitud de onda 250 nm
- Presión 147 bar



- Experimento 7 correspondiente al nivel A+ B- C- D+

Condiciones cromatográficas

- Columna: Zorbax Extend C18
- Fase móvil: Solución 13 mM de amidosulfonato de amonio en solución amortiguadora de fosfatos 0.0653 M pH=2.5 al 85 % - con 15 % de acetonitrilo.
- Flujo: 1.8 ml/min.
- Temperatura de la columna: Ambiente
- Volumen de inyección: 40 μ l
- Longitud de onda 250 nm
- Presión 72 bar

- Experimento 8 correspondiente al nivel A- B+ C- D-

Condiciones cromatográficas

- Columna: Zorbax Extend C18
- Fase móvil: Solución 13 mM de amidosulfonato de amonio en solución amortiguadora de fosfatos 0.0653 M pH=5.0 al 65 % - con 35 % de acetonitrilo.
- Flujo: 1.8 ml/min.
- Temperatura de la columna: Ambiente
- Volumen de inyección: 40 μ l
- Longitud de onda 250 nm
- Presión 75 bar

- Experimento 9 correspondiente al nivel A- B- C- D+

Condiciones cromatográficas

- Columna: Zorbax Extend C18
- Fase móvil: Solución 13 mM de amidosulfonato de amonio en solución amortiguadora de fosfatos 0.0653 M pH=2.5 al 65 % - con 35 % de acetonitrilo.
- Flujo: 1.8 ml/min.
- Temperatura de la columna: Ambiente
- Volumen de inyección: 40 μ l
- Longitud de onda 250 nm
- Presión 75 bar



- Experimento 10 correspondiente al nivel A+ B+ C- D+

Condiciones cromatográficas

- Columna: Zorbax Extend C18
- Fase móvil: Solución 13 mM de amidosulfonato de amonio en solución amortiguadora de fosfatos 0.0653 M pH=5.0 al 85 % - con 15 % de acetonitrilo.
- Flujo: 1.8 ml/min.
- Temperatura de la columna: Ambiente
- Volumen de inyección: 40 μ l
- Longitud de onda 250 nm
- Presión 73 bar

- Experimento 11 correspondiente al nivel A+ B+ C- D-

Condiciones cromatográficas

- Columna: Waters Spherisorb C18
- Fase móvil: Solución 13 mM de amidosulfonato de amonio en solución amortiguadora de fosfatos 0.0653 M pH=5.0 al 85 % - con 15 % de acetonitrilo.
- Flujo: 1.8 ml/min.
- Temperatura de la columna: Ambiente
- Volumen de inyección: 40 μ l
- Longitud de onda 250 nm
- Presión 138 bar

- Experimento 12 correspondiente al nivel A- B- C+ D-

Condiciones cromatográficas

- Columna: Zorbax Eclipse C18
- Fase móvil: Solución 13 mM de amidosulfonato de amonio en solución amortiguadora de fosfatos 0.0653 M pH=2.5 al 65 % - con 35 % de acetonitrilo.
- Flujo: 1.8 ml/min.
- Temperatura de la columna: Ambiente
- Volumen de inyección: 40 μ l
- Longitud de onda 250 nm
- Presión 251 bar



- Experimento 13 correspondiente al nivel A+ B+ C+ D+

Condiciones cromatográficas

- Columna: Merck C18
- Fase móvil: Solución 13 mM de amidosulfonato de amonio en solución amortiguadora de fosfatos 0.0653 M pH=5.0 al 85 % - con 15 % de acetonitrilo.
- Flujo: 1.8 ml/min.
- Temperatura de la columna: Ambiente
- Volumen de inyección: 40 µl
- Longitud de onda 250 nm
- Presión 219 bar

- Experimento 14 correspondiente al nivel A- B+ C+ D+

Condiciones cromatográficas

- Columna: Merck C18
- Fase móvil: Solución 13 mM de amidosulfonato de amonio en solución amortiguadora de fosfatos 0.0653 M pH=5.0 al 65 % - con 15 % de acetonitrilo.
- Flujo: 1.8 ml/min.
- Temperatura de la columna: Ambiente
- Volumen de inyección: 40 µl
- Longitud de onda 250 nm
- Presión 229 bar

- Experimento 15 correspondiente al nivel A+ B- C+ D+

Condiciones cromatográficas

- Columna: Merck C18
- Fase móvil: Solución 13 mM de amidosulfonato de amonio en solución amortiguadora de fosfatos 0.0653 M pH=2.5 al 85 % - con 15 % de acetonitrilo.
- Flujo: 1.8 ml/min.
- Temperatura de la columna: Ambiente
- Volumen de inyección: 40 µl
- Longitud de onda 250 nm
- Presión 220 bar




- Experimento 16 correspondiente al nivel A- B- C+ D+

Condiciones cromatográficas

- Columna: Merck C18
- Fase móvil: Solución 13 mM de amidosulfonato de amonio en solución amortiguadora de fosfatos 0.0653 M pH=2.5 al 85 % - con 15 % de acetonitrilo.
- Flujo: 1.8 ml/min.
- Temperatura de la columna: Ambiente
- Volumen de inyección: 40 μ l
- Longitud de onda 250 nm
- Presión 230 bar



Capitulo III



Resultados



4.1 Resultados

En esta sección de la tesis se presentaran los resultados de las respuestas obtenidas bajo las condiciones establecidas para cada nivel. Cabe señalar que las respuestas a estudiar son: tiempo de análisis, número de platos teóricos, factor de capacidad, resolución, simetría, en donde fueron obtenidas por el software Chemical Station del equipo cromatográfico y la utilización del software EXEL para obtener el factor determinación del área (r^2 área).

4.2 Identificación de parámetros

En la siguiente tablas se muestra las respuestas para furazolidona por triplicado, en donde K1, K2 y K3 corresponden a las replicas, mientras que los valores de 50, 75, 100, 125 y 150 %, corresponde a las concentraciones de 10.60 $\mu\text{g/ml}$, 15.90 $\mu\text{g/ml}$, 21.20 $\mu\text{g/ml}$, 26.50 $\mu\text{g/ml}$ y 31.80 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente y se entiende por número de platos teóricos = N, se entiende por factor de capacidad = K', se entiende por resolución entre de la furazolidona y el nipagin = R, se entiende por simetría = S, se entiende por tiempo de retención = Tr, se entiende por coeficiente determinación área = r^2 área y se entiende por tiempo de análisis = Ta.

4.3 Condiciones Normales

Tabla 4.3.1 Resultados de las respuestas para condiciones normales, correspondientes a la primera replica.

Nivel a estudiar		-Condiciones normales-					K1
Concentración	Respuestas a estudio						
Furazolidona	N	K'	R	S	Tr	Ta	
50%	5241	2.12	7.54	0.46	2.71	19.067	
75%	5266	2.06	7.67	0.45	2.67	18.728	
100%	5409	2.05	7.67	0.45	2.66	18.536	
125%	5126	2.02	7.49	0.45	2.64	18.294	
150%	5051	2.00	7.54	0.46	2.61	18.098	
Promedio	5218.6	2.05	7.582	0.454	2.66	18.54	
						Area r^2 1	

Tabla 4.3.2 Resultados de las respuestas para condiciones normales, correspondientes a la segunda replica.

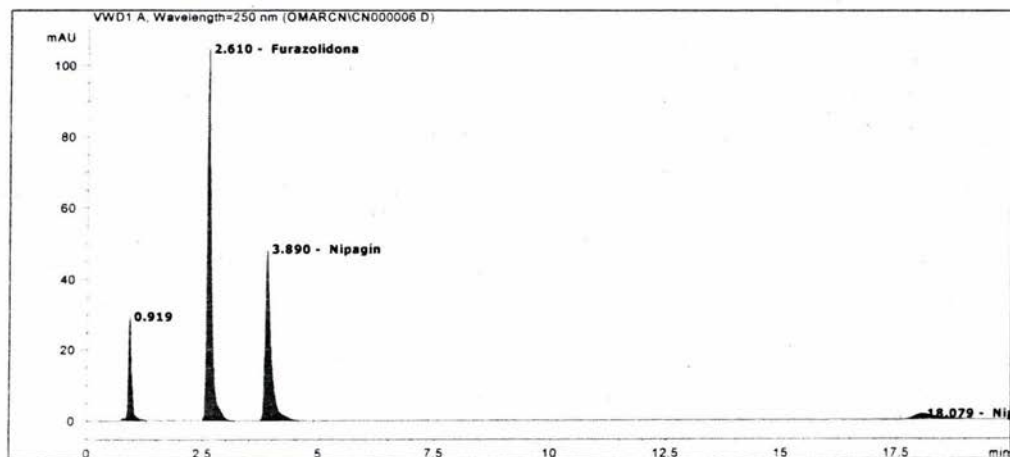
Nivel a estudiar		-Condiciones normales-					K2
Concentración	Respuestas a estudio						
Furazolidona	N	K'	R	S	Tr	Ta	
50%	5026	1.99	7.52	0.45	2.61	18.079	
75%	5233	2.00	7.58	0.45	2.612	18.189	
100%	5064	2.00	7.53	0.45	2.62	18.24	
125%	5069	2.01	7.47	0.44	2.621	18.283	
150%	5077	2.01	7.52	0.45	2.624	18.282	
Promedio	5093.8	2.00	7.52	0.45	2.61	18.21	
						Area r^2 0.9999	



Tabla 4.3.3 Resultados de las respuestas para condiciones normales, correspondientes a la tercera replica.

Nivel a estudiar		-Condiciones normales-					K3
Concentración	Respuestas a estudio						Area r ²
Furazolidona	N	K'	R	S	Tr	Ta	
50%	5074	2.01	7.47	0.44	2.623	18.26	1
75%	5084	2.01	7.53	0.45	2.626	18.326	
100%	4895	2.01	7.41	0.44	2.626	18.344	
125%	5076	2.01	7.44	0.45	2.623	18.372	
150%	5106	2.02	7.55	0.45	2.631	18.284	
Promedio	5047	2.01	7.48	0.45	2.63	18.32	

Figura 4.3 Cromatograma representativo bajo las condiciones "normales", en donde el segundo pico corresponde a la furazolidona, el tercer pico al Nipagin y el cuarto pico corresponde al Nipasol.





4.4 Nivel A- B+ C+ D-

Tabla 4.4.1 Resultados de las respuestas para A- B+ C+ D-, correspondientes a la primera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A- B+ C+ D-					K1
Concentración	N	K'	Respuestas a estudiar				Area r ² 0.9997
Furazolidona			R-01	S	Tr	Ta	
50%	3484.00	0.95	7.40	0.46	1.70	5.81	
75%	3716.00	0.94	7.30	0.48	1.70	5.79	
100%	3589.00	0.94	7.11	0.47	1.70	5.80	
125%	3588.00	0.94	6.99	0.47	1.70	5.80	
150%	1056.00	0.94	4.87	0.47	1.69	5.78	
Promedio	3086.60	0.94	6.73	0.47	1.70	5.79	

Tabla 4.4.2 Resultados de las respuestas para A- B+ C+ D-, correspondientes a la segunda replica.

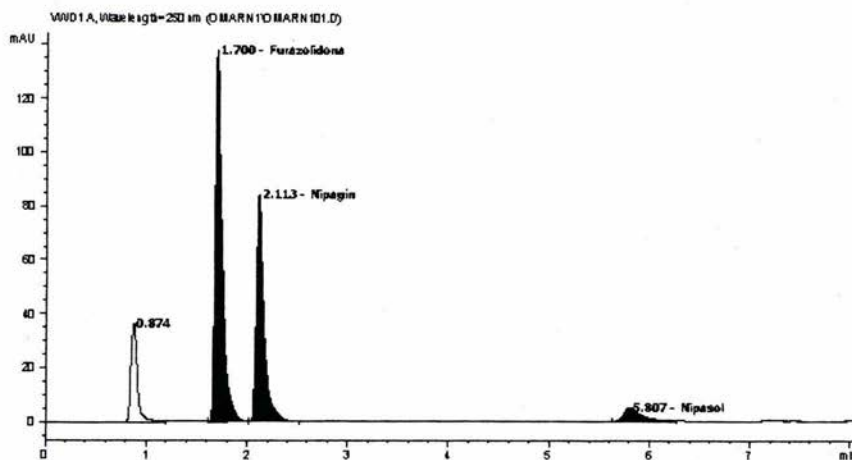
Nivel a estudiar		Condiciones A- B+ C+ D-					K2
Concentración	N	K'	Respuestas a estudiar				Area r ² 0.9998
Furazolidona			R-01	S	Tr	Ta	
50%	3458.00	0.95	7.30	0.45	1.69	5.77	
75%	3581.00	0.95	7.26	0.46	1.70	5.79	
100%	3569.00	0.94	7.05	0.47	1.69	5.78	
125%	3467.00	0.95	6.86	0.47	1.70	5.78	
150%	1069.00	0.95	4.88	0.47	1.70	5.77	
Promedio	3028.80	0.95	6.67	0.46	1.69	5.78	

Tabla 4.4.3 Resultados de las respuestas para A- B+ C+ D-, correspondientes a la tercera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A- B+ C+ D-					K2
Concentración	N	K'	Respuestas a estudiar				Area r ² 0.9998
Furazolidona			R-01	S	Tr	Ta	
50%	3458.00	0.95	7.30	0.45	1.69	5.77	
75%	3581.00	0.95	7.26	0.46	1.70	5.79	
100%	3569.00	0.94	7.05	0.47	1.69	5.78	
125%	3467.00	0.95	6.86	0.47	1.70	5.78	
150%	1069.00	0.95	4.88	0.47	1.70	5.77	
Promedio	3028.80	0.95	6.67	0.46	1.69	5.78	



Figura 4.4 Cromatograma representativo bajo las condiciones "normales", en donde el segundo pico corresponde a la furazolidona, el tercer pico al Nipagin y el cuarto pico corresponde al Nípasol.



4.5 Nivel A- B+ C- D-

Tabla 4.5.1 Resultados de las respuestas para A- B+ C- D-, correspondientes a la primera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A- B+ C- D-					K1
Concentración	N	K'	R	S	Tr	Ta	Area r ²
Furazolidona							
50%	950.00	0.74	0.83	0.67	0.68	1.68	
75%	960.00	0.74	0.82	0.67	0.68	1.67	
100%	958.00	0.74	0.83	0.66	0.68	1.67	
125%	193.00	0.74	0.54	0.66	0.68	1.67	
150%	190.00	0.73	0.54	0.67	0.68	1.66	
Promedio	650.20	0.74	0.71	0.67	0.68	1.67	

Tabla 4.5.2 Resultados de las respuestas para A- B+ C- D-, correspondientes a la segunda replica.

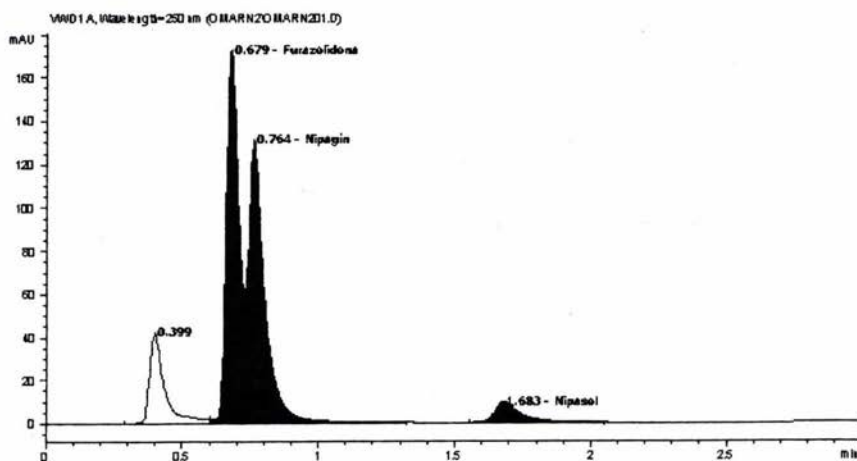
Nivel a estudiar		Condiciones A- B+ C- D-					K2
Concentración	N	K'	R	S	Tr	Ta	Area r ²
Furazolidona							
50%	987.00	0.74	0.84	0.66	0.68	1.67	
75%	973.00	0.74	0.83	0.67	0.68	1.67	
100%	944.00	0.74	0.82	0.67	0.68	1.67	
125%	195.00	0.73	0.54	0.67	0.68	1.67	
150%	195.00	0.73	0.54	0.67	0.68	1.67	
Promedio	658.80	0.73	0.71	0.67	0.68	1.67	



Tabla 4.5.3 Resultados de las respuestas para A- B+ C- D-, correspondientes a la tercera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A- B+ C- D-					K3
Concentración	Respuestas a estudiar						
Furazolidona	N	K'	R	S	Tr	Ta	Area r^2
50%	986.00	0.74	0.83	0.67	0.68	1.67	
75%	958.00	0.74	0.82	0.67	0.68	1.67	
100%	984.00	0.73	0.84	0.67	0.68	1.67	
125%	195.00	0.74	0.54	0.67	0.68	1.67	
150%	195.00	0.73	0.54	0.67	0.68	1.67	
Promedio	663.60	0.73	0.71	0.67	0.68	1.67	0.9997

Figura 4.5 Cromatograma representativo bajo las condiciones "A- B+ C- D-", en donde el segundo pico corresponde a la furazolidona, el tercer pico al Nipagin y el cuarto pico corresponde al Nipasol.





4.6 Nivel A+ B+ C+ D-

Tabla 4.6.1 Resultados de las respuestas para A+ B+ C+ D-, correspondientes a la primera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A+ B+ C+ D-					K1
Concentración	Respuestas a estudiar						
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	5.18	0.33	3631.00	12.18	4.57	105.69	
75%	5.18	0.33	3560.00	12.50	4.56	105.69	
100%	5.19	0.33	3708.00	12.26	4.57	102.50	Area
125%	5.21	0.33	3602.00	12.13	4.59	106.44	r^2
150%	5.25	0.33	3786.00	12.30	4.62	108.14	0.9994
Promedio	5.20	0.33	3657.40	12.27	4.58	105.69	

Tabla 4.6.2 Resultados de las respuestas para A+ B+ C+ D-, correspondientes a la segunda replica.

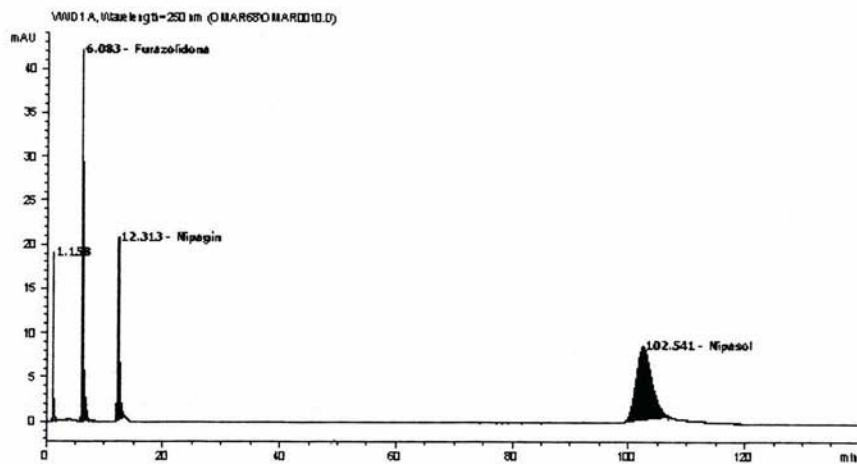
Nivel a estudiar		Condiciones A+ B+ C+ D-					K2
Concentración	Respuestas a estudiar						
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	5.26	0.33	3729.00	12.28	4.63	105.69	
75%	5.27	0.33	3669.00	12.26	4.63	105.69	
100%	5.28	0.33	3680.00	12.28	4.64	102.50	Area
125%	5.30	0.33	3700.00	12.12	4.65	106.44	r^2
150%	5.32	0.33	3733.00	12.18	4.67	108.14	0.9996
Promedio	5.29	0.33	3702.20	12.22	4.64	105.69	

Tabla 4.6.3 Resultados de las respuestas para A+ B+ C+ D-, correspondientes a la tercera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A+ B+ C+ D-					K3
Concentración	Respuestas a estudiar						
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	5.33	0.33	3739.00	12.21	4.68	105.69	
75%	5.34	0.32	3615.00	12.04	4.68	105.69	
100%	5.34	0.32	3754.00	12.22	4.69	102.50	Area
125%	5.35	0.32	3760.00	12.23	4.69	106.44	r^2
150%	5.37	0.33	3787.00	12.28	4.71	108.14	0.9979
Promedio	5.35	0.32	3731.00	12.20	4.69	105.69	



Figura 4.6 Cromatograma representativo bajo las condiciones A+ B+ C+ D- , en donde el segundo pico corresponde a la furazolidona, el tercer pico al Nipagin y el cuarto pico corresponde al Nípasol.



4.7 Nivel A+ B- C+ D-

Tabla 4.7.1 Resultados de las respuestas para A+ B- C+ D-, correspondientes a la primera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A+ B- C+ D-				K1	
Concentración	Respuestas a estudiar						Area r ²
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	4.67	0.35	3692.00	12.12	4.95	99.49	0.9995
75%	5.43	0.46	6143.00	13.39	5.61	99.49	
100%	5.39	0.45	6195.00	13.56	5.57	97.66	
125%	5.38	0.44	6299.00	13.59	5.56	99.44	
150%	5.39	0.44	6628.00	13.62	5.58	101.37	
Promedio	5.25	0.43	5791.40	13.26	5.45	99.49	



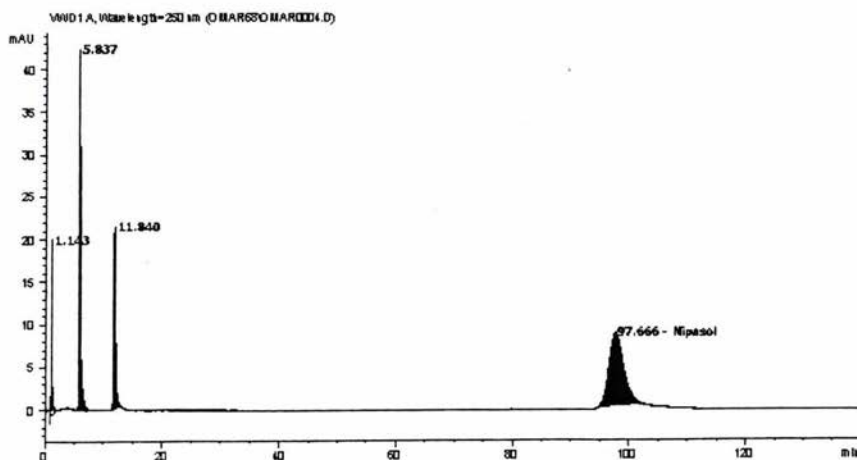
Tabla 4.7.2 Resultados de las respuestas para A+ B- C+ D-, correspondientes a la segunda replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A+ B- C+ D-				K2	
Concentración	Respuestas a estudiar						
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	Area
50%	5.41	0.43	6236.00	13.72	2.59	99.49	
75%	5.42	0.43	6248.00	13.72	5.60	99.49	
100%	5.41	0.43	6352.00	13.74	5.59	97.66	
125%	5.40	0.43	6464.00	13.86	5.58	99.44	
150%	5.39	0.43	6325.00	13.81	5.58	101.37	
Promedio	5.41	0.43	6325.00	13.77	4.99	99.49	0.9989

Tabla 4.7.3 Resultados de las respuestas para A+ B- C+ D-, correspondientes a la tercera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A+ B- C+ D-				K3	
Concentración	Respuestas a estudiar						
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	Area
50%	5.40	0.42	6474.00	13.98	5.58	99.49	
75%	5.41	0.42	6481.00	13.90	5.59	99.49	
100%	5.40	0.42	6342.00	13.84	5.58	97.66	
125%	5.39	0.42	6455.00	13.87	5.58	99.44	
150%	5.40	0.42	6346.00	13.85	5.59	101.37	
Promedio	5.40	0.42	6419.60	13.89	5.58	99.49	0.995

Figura 4.7 Cromatograma representativo bajo las condiciones A+ B- C+ D-, en donde el segundo pico corresponde a la furazolidona, el tercer pico al Nipagin y el cuarto pico corresponde al Nipasol.





4.8 Nivel A+ B- C- D-

Tabla 4.8.1 Resultados de las respuestas para A+ B- C- D-, correspondientes a la primera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A+ B- C- D-					K1
Concentración	Respuestas a estudiar						
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	3.82	0.58	2188.00	6.05	1.92	19.23	
75%	3.82	0.57	2191.00	6.04	1.92	19.23	
100%	3.82	0.58	2265.00	6.11	1.92	19.20	Area
125%	3.84	0.58	2207.00	6.05	1.93	19.20	r^2
150%	3.85	0.57	2223.00	6.07	1.94	19.30	0.9976
Promedio	3.83	0.57	2214.80	6.06	1.93	19.23	

Tabla 4.8.2 Resultados de las respuestas para A+ B- C- D-, correspondientes a la segunda replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A+ B- C- D-					K2
Concentración	Respuestas a estudiar						
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	3.85	0.58	2299.00	6.11	1.94	19.23	
75%	3.85	0.59	2223.00	6.11	1.94	19.23	
100%	3.88	0.58	2245.00	6.08	1.94	19.20	Area
125%	3.86	0.58	2226.00	6.06	1.94	19.20	r^2
150%	3.86	0.58	2228.00	6.05	1.94	19.30	0.9994
Promedio	3.86	0.59	2244.20	6.08	1.94	19.23	

Tabla 4.8.3 Resultados de las respuestas para A+ B- C- D-, correspondientes a la tercera replica.

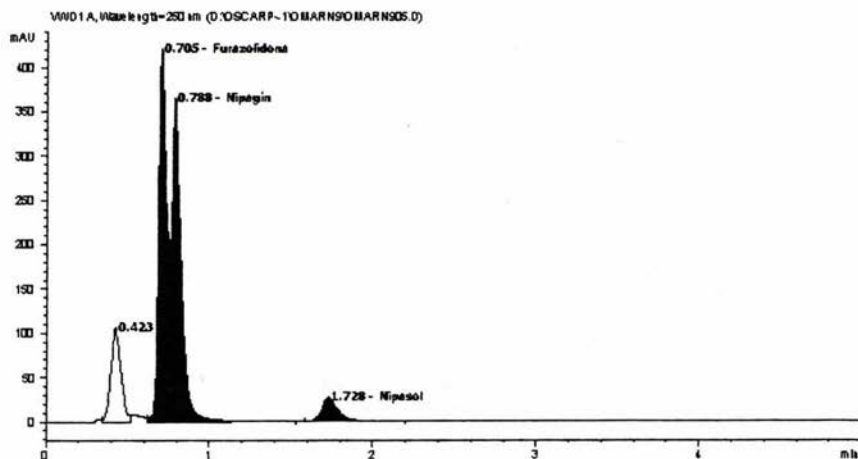
Nivel a estudiar		Condiciones A+ B- C- D-					K3
Concentración	Respuestas a estudiar						
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	3.88	0.59	2250.00	6.08	1.95	19.23	
75%	3.89	0.58	2253.00	6.09	1.95	19.23	
100%	3.90	0.58	2261.00	6.09	1.95	19.20	Area
125%	3.89	0.57	2643.00	6.00	1.95	19.20	r^2
150%	3.90	0.58	2261.00	6.05	1.95	19.30	0.988
Promedio	3.89	0.58	2333.60	6.06	1.95	19.23	



Tabla 4.9.3 Resultados de las respuestas para A- B- C- D-, correspondientes a la tercera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A- B- C- D-					K3
Concentración			Respuestas a estudiar				
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	0.76	0.68	738	0.73	0.70	1.73	
75%	0.76	0.67	732	0.74	0.70	1.73	
100%	0.76	0.65	587	0.71	0.70	1.72	
125%	0.76	0.64	565	0.7	0.70	1.72	
150%	0.76	0.63	797	0.77	0.70	1.72	
Promedio	0.76	0.63	683.80	0.73	0.70	1.72	Area r ² 0.9981

Figura 4.9 Cromatograma representativo bajo las condiciones A- B- C- D-, en donde el segundo pico corresponde a la furazolidona, el tercer pico al Nipagin y el cuarto pico corresponde al Nipasol.





4.10 Nivel A+ B- C- D+

Tabla 4.10.1 Resultados de las respuestas para A+ B- C- D+, correspondientes a la primera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A+ B- C- D+						K1
Concentración		Respuestas a estudiar						
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta		
50%	2.21	0.72	397.00	4.14	0.99	30.26		
75%	2.79	0.72	554.00	4.75	1.17	30.26		
100%	3.17	0.78	653.00	5.03	1.29	30.30		
125%	3.40	0.79	725.00	5.26	1.35	30.20	Area	
150%	3.52	0.80	767.00	5.45	1.39	30.30	r^2	
Promedio	3.02	0.76	619.20	4.93	1.24	30.27	0.9985	

Tabla 4.10.2 Resultados de las respuestas para A+ B- C- D+, correspondientes a la segunda replica.

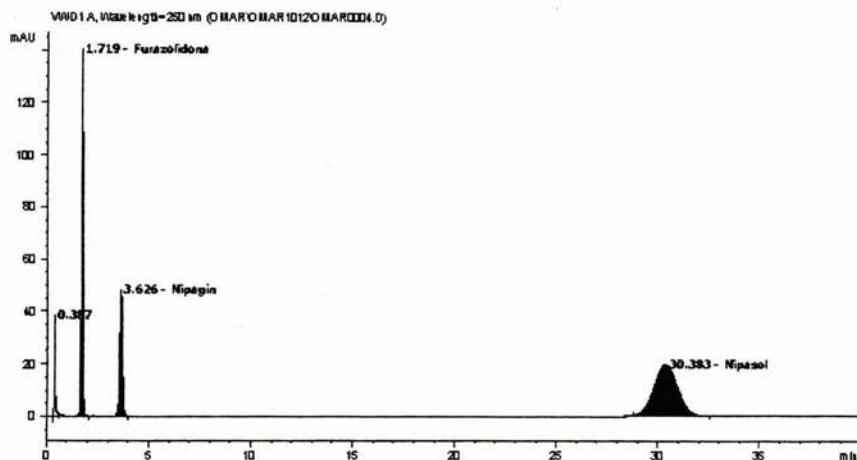
Nivel a estudiar		Condiciones A+ B- C- D+						K2
Concentración		Respuestas a estudiar						
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta		
50%	3.83	0.87	639.00	5.04	1.49	30.26		
75%	4.03	0.92	693.00	5.24	1.55	30.26		
100%	4.13	0.93	777.00	5.64	1.58	30.30	Area	
125%	4.17	0.93	897.00	6.03	1.59	30.20	r^2	
150%	4.18	0.92	950.00	6.21	1.59	30.30	0.9996	
Promedio	4.07	0.91	791.20	5.63	1.56	30.27		

Tabla 4.10.3 Resultados de las respuestas para A+ B- C- D+, correspondientes a la tercera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A+ B- C- D+						K3
Concentración		Respuestas a estudiar						
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta		
50%	4.28	0.96	889.00	6.07	1.63	30.26		
75%	4.34	0.96	104.00	6.59	1.64	30.26		
100%	4.36	0.94	1174.00	7.03	1.65	30.30	Area	
125%	4.37	0.94	1249.00	7.18	1.65	30.20	r^2	
150%	4.38	0.95	1293.00	7.31	1.66	30.30	0.9994	
Promedio	4.35	0.95	941.80	6.84	1.65	30.27		



Figura 4.10 Cromatograma representativo bajo las condiciones A+ B- C- D+, en donde el segundo pico corresponde a la furazolidona, el tercer pico al Nipagin y el cuarto pico corresponde al Nipasol.



4.11 Nivel A- B+ C- D+

Tabla 4.11.1 Resultados de las respuestas para A- B+ C- D+, correspondientes a la primera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A- B+ C- D+					K1
Concentración	Respuestas a estudiar						
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	Area r ² 0.9992
50%	0.89	0.68	1280.00	1.96	0.58	1.84	
75%	0.90	0.68	1341.00	2.01	0.58	1.84	
100%	0.90	0.69	202.00	1.13	0.58	1.84	
125%	0.90	0.69	203.00	0.93	0.59	1.84	
150%	0.90	0.69	202.00	0.93	0.59	1.84	
Promedio	0.90	0.69	645.60	1.39	0.58	1.84	



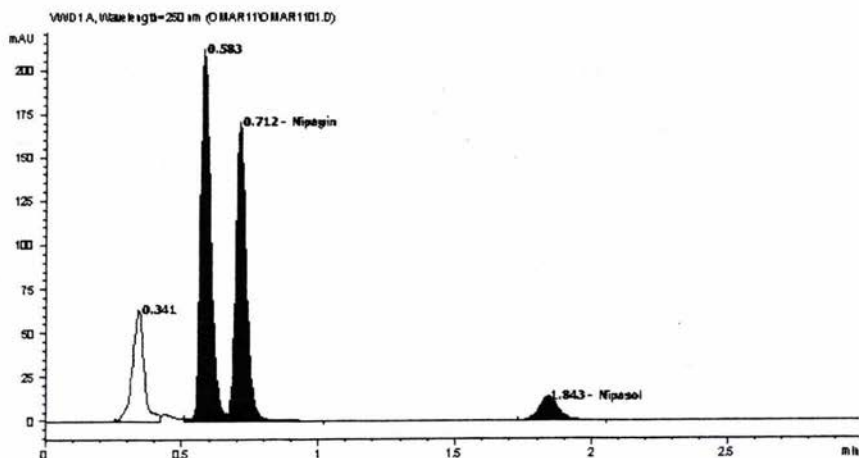
Tabla 4.11.2 Resultados de las respuestas para A- B+ C- D+, correspondientes a la segunda replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A- B+ C- D+				K2	
Concentración	Respuestas a estudiar						
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	0.89	0.68	1337.00	1.99	0.58	1.84	
75%	0.90	0.68	1372.00	2.02	0.58	1.84	
100%	0.90	0.69	206.00	1.14	0.58	1.84	
125%	0.90	0.69	203.00	0.93	0.59	1.85	
150%	0.91	0.69	199.00	0.92	0.59	1.85	
Promedio	0.90	0.69	663.40	1.40	0.58	1.85	
						Area	
						r ²	
						0.9998	

Tabla 4.11.3 Resultados de las respuestas para A- B+ C- D+, correspondientes a la tercera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A- B+ C- D+				K3	
Concentración	Respuestas a estudiar						
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	0.90	0.68	1314.00	1.98	0.58	1.85	
75%	0.90	0.69	1377.00	2.02	0.59	1.85	
100%	0.90	0.68	198.00	1.13	0.59	1.85	
125%	0.90	0.69	205.00	1.15	0.59	1.85	
150%	0.91	0.69	200.00	0.92	0.59	1.85	
Promedio	0.90	0.69	658.80	1.44	0.59	1.85	
						Area	
						r ²	
						0.9998	

Figura 4.11 Cromatograma representativo bajo las condiciones A- B+ C- D+, en donde el segundo pico corresponde a la furazolidona, el tercer pico al Nipagin y el cuarto pico corresponde al Nípasol.





4.12 Nivel A- B- C- D+

Tabla 4.12.1 Resultados de las respuestas para A- B- C- D+, correspondientes a la primera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A- B- C- D+					K1
Concentración		Respuestas a estudiar					
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	0.91	0.67	1769.00	2.28	0.59	1.83	
75%	0.91	0.67	1862.00	2.31	0.59	1.83	
100%	0.91	0.68	226.00	1.21	0.59	1.82	
125%	0.91	0.67	223.00	0.97	0.59	1.82	
150%	0.91	0.68	221.00	0.97	0.59	1.82	
Promedio	0.91	0.67	860.20	1.55	0.59	1.82	
						Area r ² 0.9995	

Tabla 4.12.2 Resultados de las respuestas para A- B- C- D+, correspondientes a la segunda replica.

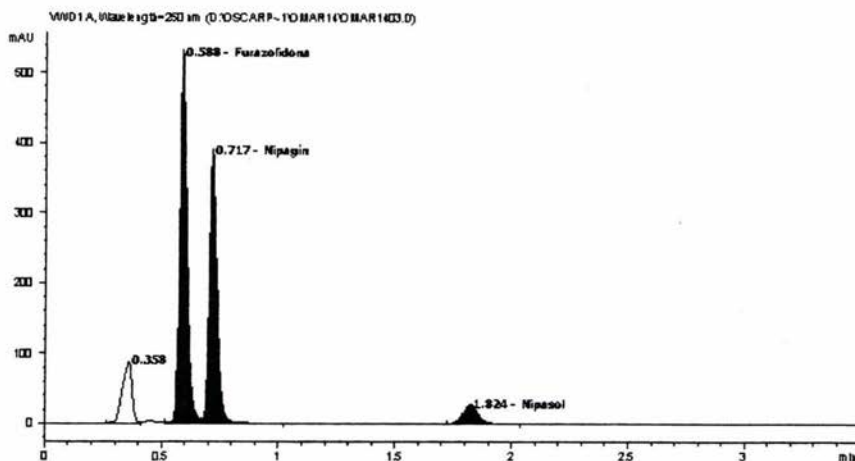
Nivel a estudiar		Condiciones A- B- C- D+					K2
Concentración		Respuestas a estudiar					
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	0.91	0.68	1856.00	2.31	0.59	1.82	
75%	0.91	0.67	231.00	1.22	0.59	1.82	
100%	0.91	0.68	226.00	1.21	0.59	1.82	
125%	0.91	0.68	224.00	0.98	0.59	1.82	
150%	0.91	0.68	1901.00	1.59	0.59	1.82	
Promedio	0.91	0.68	887.60	1.46	0.59	1.82	
						Area r ² 0.9997	

Tabla 4.12.3 Resultados de las respuestas para A- B- C- D+, correspondientes a la tercera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A- B- C- D+					K3
Concentración		Respuestas a estudiar					
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	0.91	0.68	1852.00	2.31	0.59	1.82	
75%	0.91	0.67	229.00	1.21	0.59	1.82	
100%	0.91	0.68	255.00	1.20	0.59	1.82	
125%	0.91	0.68	224.00	0.98	0.59	1.82	
150%	0.91	0.69	222.00	0.97	0.59	1.82	
Promedio	0.91	0.68	556.40	1.33	0.59	1.82	
						Area r ² 0.9997	



Figura 4.12 Cromatograma representativo bajo las condiciones A- B- C- D+ , en donde el segundo pico corresponde a la furazolidona, el tercer pico al Nipagin y el cuarto pico corresponde al Nipasol.



4.13 Nivel A+ B+ C- D+

Tabla 4.13.1 Resultados de las respuestas para A+ B+ C- D+ , correspondientes a la primera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A+ B+ C- D+					K1
Concentración		Respuestas a estudiar					
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	6.19	0.89	2776.00	17.19	2.21	31.56	
75%	6.12	0.89	2781.00	17.28	2.19	31.56	
100%	6.08	0.89	2818.00	17.21	2.18	31.40	
125%	6.10	0.90	2833.00	17.26	2.19	31.60	
150%	6.08	0.90	2752.00	17.10	2.18	31.70	
Promedio	6.11	0.89	2792.00	17.21	2.19	31.56	Area r ² 0.9989



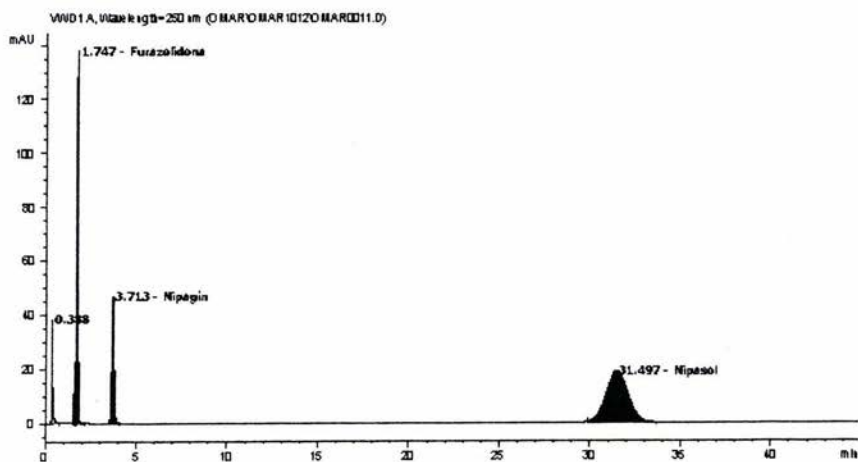
Tabla 4.13.2 Resultados de las respuestas para A+ B+ C- D+, correspondientes a la segunda replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A+ B+ C- D+					K2
Concentración		Respuestas a estudiar					
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	6.07	0.88	2804.00	17.14	2.18	31.56	
75%	6.14	0.89	2800.00	17.18	2.20	31.56	
100%	6.15	0.90	2746.00	17.14	2.20	31.40	Area
125%	6.17	0.90	2757.00	17.09	2.21	31.60	r ²
150%	6.27	0.90	2681.00	17.09	2.24	31.70	0.9998
Promedio	6.16	0.89	2757.60	17.13	2.20	31.56	

Tabla 4.13.3 Resultados de las respuestas para A+ B+ C- D+, correspondientes a la tercera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A+ B+ C- D+					K3
Concentración		Respuestas a estudiar					
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	6.28	0.90	2785.00	17.11	2.42	31.56	
75%	6.26	0.89	2769.00	17.16	2.24	31.56	
100%	6.24	0.90	2750.00	17.18	2.23	31.40	Area
125%	6.26	0.90	2769.00	17.07	2.24	31.60	r ²
150%	6.21	0.89	2823.00	17.06	2.22	31.70	0.9985
Promedio	6.25	0.90	2779.20	17.12	2.27	31.56	

Figura 4.13 Cromatograma representativo bajo las condiciones A+ B+ C- D+, en donde el segundo pico corresponde a la furazolidona, el tercer pico al Nipagin y el cuarto pico corresponde al Nipasol.





4.14 Nivel A+ B+ C- D-

Tabla 4.14.1 Resultados de las respuestas para A+ B+ C- D-, correspondientes a la primera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A+ B+ C- D-					K1
Concentración		Respuestas a estudiar					
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	6.04	1.25	1858.00	9.78	2.81	20.12	
75%	6.00	1.20	1875.00	9.74	2.79	20.12	
100%	5.98	1.23	1865.00	9.78	2.78	20.15	
125%	5.93	1.36	1841.00	9.70	2.77	20.10	
150%	5.88	1.24	1815.00	9.70	2.75	20.14	
Promedio	5.97	1.26	1850.80	9.74	2.78	20.13	Area r ² 0.9988

Tabla 4.14.2 Resultados de las respuestas para A+ B+ C- D-, correspondientes a la segunda replica.

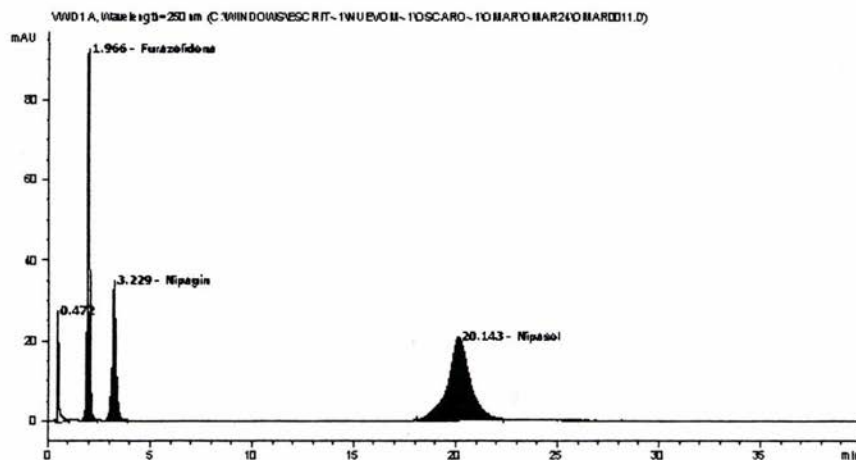
Nivel a estudiar		Condiciones A+ B+ C- D-					K2
Concentración		Respuestas a estudiar					
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	5.88	1.35	1777.00	9.64	2.75	20.12	
75%	5.90	1.33	1747.00	9.55	2.75	20.12	
100%	5.89	1.29	1819.00	9.61	2.75	20.15	
125%	5.92	1.32	1797.00	9.62	2.76	20.10	
150%	5.95	1.31	1772.00	9.54	2.77	20.14	
Promedio	5.91	1.32	1782.40	9.59	2.76	20.13	Area r ² 0.9918

Tabla 4.14.3 Resultados de las respuestas para A+ B+ C- D-, correspondientes a la tercera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A+ B+ C- D-					K3
Concentración		Respuestas a estudiar					
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	5.96	1.36	1776.00	9.54	2.78	20.12	
75%	5.94	1.37	1728.00	9.54	2.77	20.12	
100%	5.92	1.33	1885.00	9.43	2.76	20.15	
125%	5.93	1.28	1726.00	9.46	2.77	20.10	
150%	5.92	1.25	1757.00	9.48	2.76	20.14	
Promedio	5.93	1.32	1734.40	9.49	2.77	20.13	Area r ² 0.9908



Figura 4.14 Cromatograma representativo bajo las condiciones A+ B+ C- D-, en donde el segundo pico corresponde a la furazolidona, el tercer pico al Nipagin y el cuarto pico corresponde al Nipasol.



4.15 Nivel A- B- C+ D-

Tabla 4.15.1 Resultados de las respuestas para A- B- C+ D-, correspondientes a la primera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A- B- C+ D-					K1
Concentración		Respuestas a estudiar					
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	0.98	0.77	2726.00	2.93	1.73	5.77	
75%	0.98	0.75	2721.00	2.89	1.72	5.76	
100%	0.98	0.74	2720.00	2.90	1.72	5.76	
125%	0.98	0.73	2722.00	2.90	1.72	5.76	Area
150%	0.98	0.72	2806.00	2.29	1.73	5.77	r ²
Promedio	0.98	0.74	2739.00	2.78	1.72	5.76	0.9992



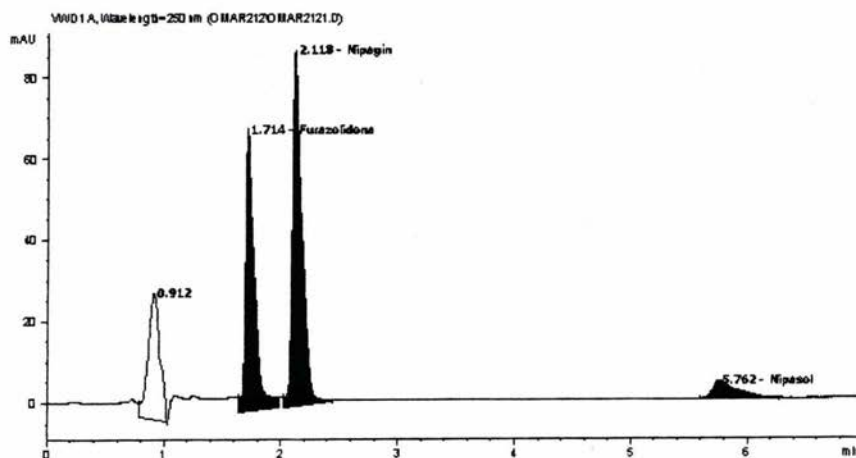
Tabla 4.15.2 Resultados de las respuestas para A- B- C+ D-, correspondientes a la segunda replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A- B- C+ D-					K2
Concentración	Respuestas a estudiar						
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	0.98	0.78	2645.00	2.86	1.72	5.76	
75%	0.98	0.75	2647.00	2.86	1.72	5.76	
100%	0.98	0.74	2642.00	2.84	1.72	5.76	
125%	0.98	0.73	2643.00	2.84	1.72	5.76	
150%	0.98	0.76	2645.00	2.84	1.71	5.77	
Promedio	0.98	0.75	2644.40	2.85	1.72	5.76	
						Area r ² 0.9987	

Tabla 4.15.3 Resultados de las respuestas para A- B- C+ D-, correspondientes a la tercera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A- B- C+ D-					K3
Concentración	Respuestas a estudiar						
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	0.98	0.76	2645.00	2.84	1.72	5.77	
75%	0.98	0.76	2727.00	2.86	1.73	5.77	
100%	0.98	0.74	2731.00	2.88	1.73	5.78	
125%	0.98	0.74	2819.00	2.67	1.73	5.79	
150%	0.98	0.73	2726.00	2.86	1.73	5.76	
Promedio	0.98	0.75	2729.60	2.82	1.73	5.77	
						Area r ² 0.9936	

Figura 4.15 Cromatograma representativo bajo las condiciones A- B- C+ D-, en donde el segundo pico corresponde a la furazolidona, el tercer pico al Nipagin y el cuarto pico corresponde al Nipasol.





4.16 Nivel A+ B+ C+ D+

Tabla 4.16.1 Resultados de las respuestas para A+ B+ C+ D+, correspondientes a la primera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A+ B+ C+ D+					K1
Concentración	Respuestas a estudiar						
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	Area
50%	3.25	0.81	3034.00	11.14	3.71	68.63	
75%	3.24	0.81	3082.00	11.25	3.70	68.63	
100%	3.25	0.81	3167.00	11.41	3.71	71.00	
125%	3.25	0.81	3172.00	11.42	3.71	68.90	
150%	3.26	0.81	3257.00	11.50	3.72	66.00	1
Promedio	3.25	0.81	3142.40	11.34	3.71	68.63	

Tabla 4.16.2 Resultados de las respuestas para A+ B+ C+ D+, correspondientes a la segunda replica.

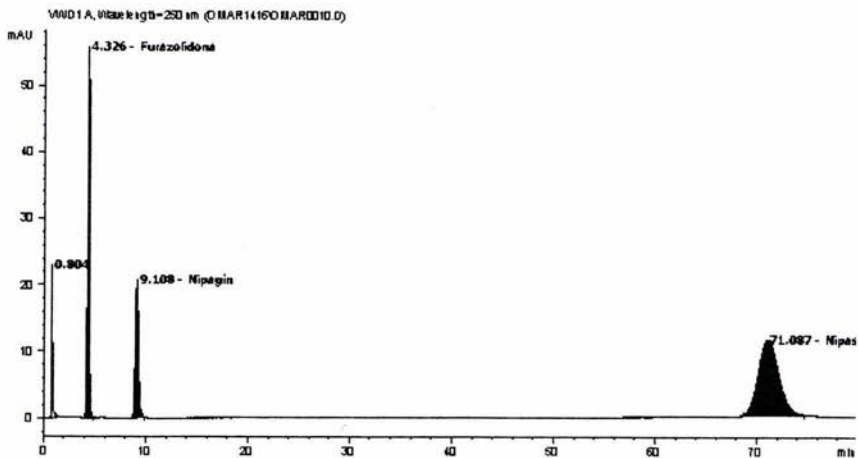
Nivel a estudiar		Condiciones A+ B+ C+ D+					K2
Concentración	Respuestas a estudiar						
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	Area
50%	3.26	0.81	2984.00	11.10	3.71	68.63	
75%	3.26	0.81	3112.00	11.22	3.71	68.63	
100%	3.26	0.81	3115.00	11.41	3.72	71.00	
125%	3.27	0.81	3275.00	11.45	3.73	68.90	
150%	3.29	0.81	3305.00	11.59	3.75	66.00	1
Promedio	3.27	0.81	3158.20	11.35	3.72	68.63	

Tabla 4.16.3 Resultados de las respuestas para A+ B+ C+ D+, correspondientes a la tercera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A+ B+ C+ D+					K3
Concentración	Respuestas a estudiar						
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	Area
50%	3.28	0.82	3022.00	11.14	3.74	68.63	
75%	3.28	0.81	3087.00	11.36	3.74	68.63	
100%	3.29	0.81	3159.00	11.11	3.74	71.00	
125%	3.30	0.81	3244.00	11.49	3.75	68.90	
150%	3.31	0.81	3261.00	11.53	3.76	66.00	0.9999
Promedio	3.29	0.81	3154.60	11.39	3.75	68.63	



Figura 4.16 Cromatógrama representativo bajo las condiciones A+ B+ C+ D+, en donde el segundo pico corresponde a la furazolidona, el tercer pico al Nipagin y el cuarto pico corresponde al Nipasol.



4.17 Nivel A- B+ C+ D+

Tabla 4.17.1 Resultados de las respuestas para A- B+ C+ D+, correspondientes a la primera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A- B+ C+ D+					K1
Concentración		Respuestas a estudiar					
	K'	S	N	R	Tr	Ta	
Furazolidona							
50%	0.98	0.68	2257.00	2.79	1.28	4.18	
75%	0.97	0.68	1882.75	2.60	1.27	4.15	
100%	0.96	0.68	2334.00	2.82	1.27	4.14	
125%	0.96	0.68	2382.00	2.85	1.26	4.14	
150%	0.96	0.67	558.00	1.92	1.26	4.14	
Promedio	0.97	0.68	1882.75	2.60	1.27	4.15	Area r^2 1



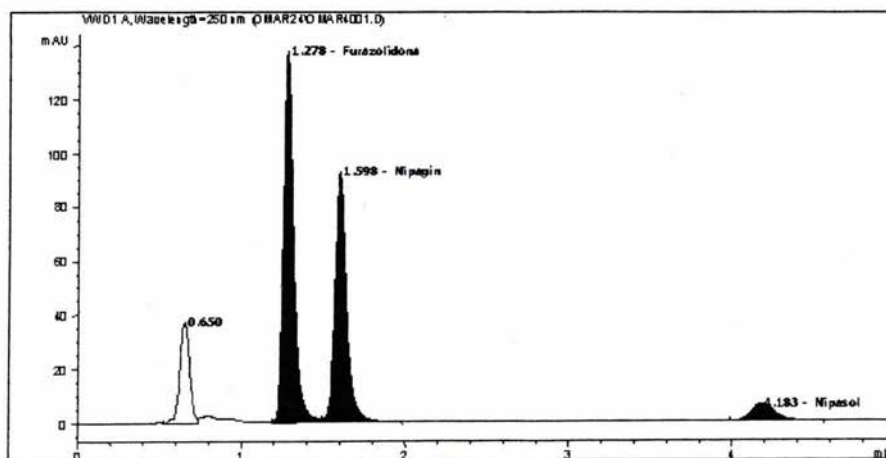
Tabla 4.17.2 Resultados de las respuestas para A- B+ C+ D+, correspondientes a la segunda replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A- B+ C+ D+				K2	
Concentración		Respuestas a estudiar					
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	0.97	0.68	2292.00	2.80	1.27	4.16	
75%	0.96	0.68	2335.00	2.82	1.27	4.15	
100%	0.96	0.68	2333.00	2.83	1.27	4.14	
125%	0.95	0.68	2302.00	2.83	1.26	4.13	Area
150%	0.96	0.67	554.00	1.92	1.26	4.12	r^2
Promedio	0.96	0.68	1963.20	2.64	1.26	4.14	1

Tabla 4.17.3 Resultados de las respuestas para A- B+ C+ D+, correspondientes a la tercera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A- B+ C+ D+				K3	
Concentración		Respuestas a estudiar					
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	0.95	0.68	2295.00	2.82	1.26	4.12	
75%	0.97	0.68	2353.00	2.85	1.27	4.14	
100%	0.95	0.68	2302.00	2.87	1.26	4.13	
125%	0.95	0.68	2290.00	2.84	1.25	4.09	Area
150%	0.94	0.68	243.00	1.43	1.25	4.08	r^2
Promedio	0.95	0.68	1896.60	2.56	1.26	4.11	0.9998

Figura 4.17 Cromatograma representativo bajo las condiciones A- B+ C+ D+ , en donde el segundo pico corresponde a la furazolidona, el tercer pico al Nipagin y el cuarto pico corresponde al Nipasol.





4.18 Nivel A+ B- C+ D+

Tabla 4.18.1 Resultados de las respuestas para A+ B- C+ D+ , correspondientes a la primera replica.

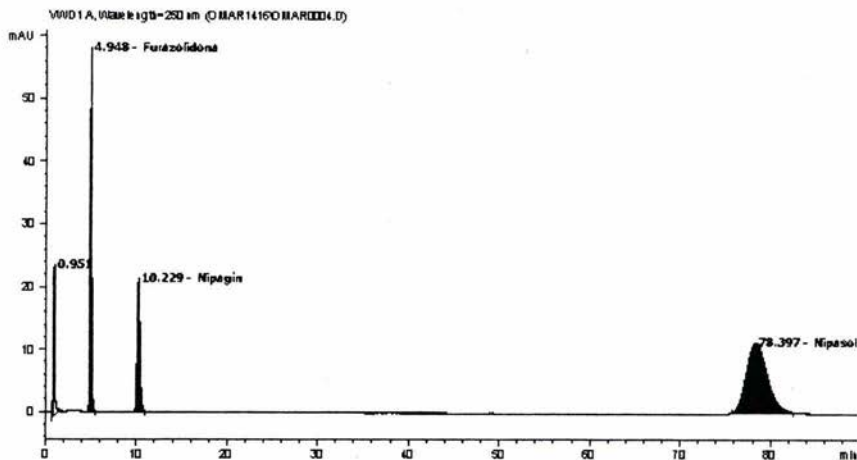
Nivel a estudiar		Condiciones A+ B- C+ D+						K1	
Concentración		Respuestas a estudiar							
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta			
50%	4.90	0.80	3130.00	11.26	3.80	77.66			
75%	4.86	0.80	3224.00	11.48	3.78	77.66			
100%	4.96	0.80	3256.00	11.41	3.84	78.30			
125%	4.84	0.79	3410.00	11.78	3.76	78.10		Area	
150%	4.80	0.80	3292.00	11.52	3.74	76.60		r^2	
Promedio	4.87	0.80	3262.40	11.49	3.78	77.66		0.9983	

Tabla 4.18.2 Resultados de las respuestas para A+ B- C+ D+ , correspondientes a la segunda replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A+ B- C+ D+						K2	
Concentración		Respuestas a estudiar							
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta			
50%	4.76	0.80	3114.00	11.32	3.71	77.66			
75%	4.83	0.80	3184.00	11.44	3.76	77.66			
100%	4.80	0.81	3224.00	11.37	3.74	78.30		Area	
125%	4.89	0.80	3396.00	11.53	3.80	78.10		r^2	
150%	4.70	0.80	3397.00	11.55	3.67	76.60		0.9993	
Promedio	4.80	0.80	3263.00	11.44	3.74	77.66			

Tabla 4.18.3 Resultados de las respuestas para A+ B- C+ D+ , correspondientes a la tercera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A+ B- C+ D+						K3	
Concentración		Respuestas a estudiar							
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta			
50%	4.67	0.80	3077.00	11.15	3.65	77.66			
75%	4.66	0.81	3136.00	11.22	3.65	77.66			
100%	4.65	0.81	3122.00	11.25	3.64	78.30		Area	
125%	4.70	0.80	3328.00	11.46	3.68	78.10		r^2	
150%	4.69	0.81	3307.00	11.45	3.67	76.60		0.9997	
Promedio	4.67	0.81	3194.00	11.31	3.66	77.66			



4.19 Nivel A- B- C+ D+

Tabla 4.19.1 Resultados de las respuestas para A- B- C+ D+, correspondientes a la primera replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A- B- C+ D+					K1
Concentración		Respuestas a estudiar					
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	0.94	0.66	2120.00	2.82	1.24	4.12	
75%	0.93	0.66	2222.00	2.88	1.24	4.10	
100%	0.93	0.65	2216.00	2.87	1.23	4.09	
125%	0.93	0.65	2272.00	2.93	1.23	4.09	Area
150%	0.92	0.65	268.00	1.54	1.23	4.08	r^2
Promedio	0.93	0.65	1819.60	2.61	1.23	4.10	0.9989

Tabla 4.19.2 Resultados de las respuestas para A- B- C+ D+, correspondientes a la segunda replica.

Nivel a estudiar		Condiciones A- B- C+ D+					K2
Concentración		Respuestas a estudiar					
Furazolidona	K'	S	N	R	Tr	Ta	
50%	0.92	0.66	2199.00	2.90	1.23	4.07	
75%	0.92	0.66	2258.00	2.89	1.23	4.07	
100%	0.92	0.68	2393.00	3.00	1.23	4.07	
125%	1.03	0.69	2459.00	3.02	1.30	4.07	Area
150%	0.92	0.65	2846.00	1.52	1.23	4.07	r^2
Promedio	0.94	0.67	2431.00	2.67	1.24	4.07	0.9999

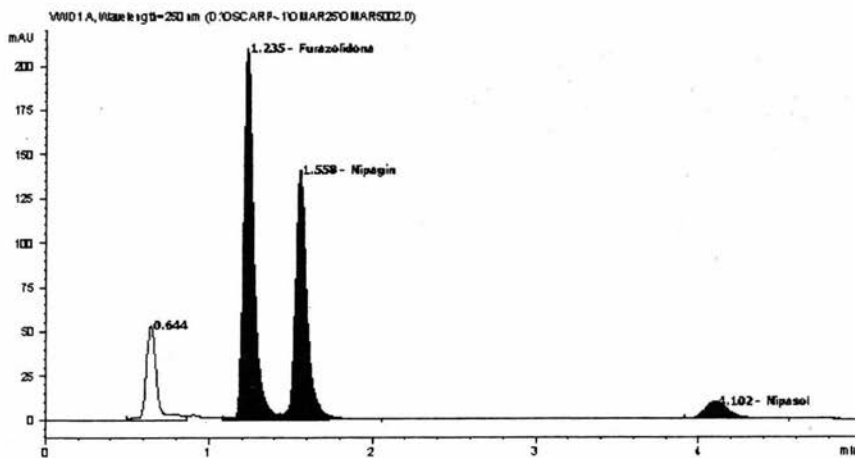
Tabla 4.19.3 Resultados de las respuestas para A- B- C+ D+, correspondientes a la tercera replica.



Tabla 4.19.3 Resultados de las respuestas para A- B- C+ D+, correspondientes a la tercera replica.

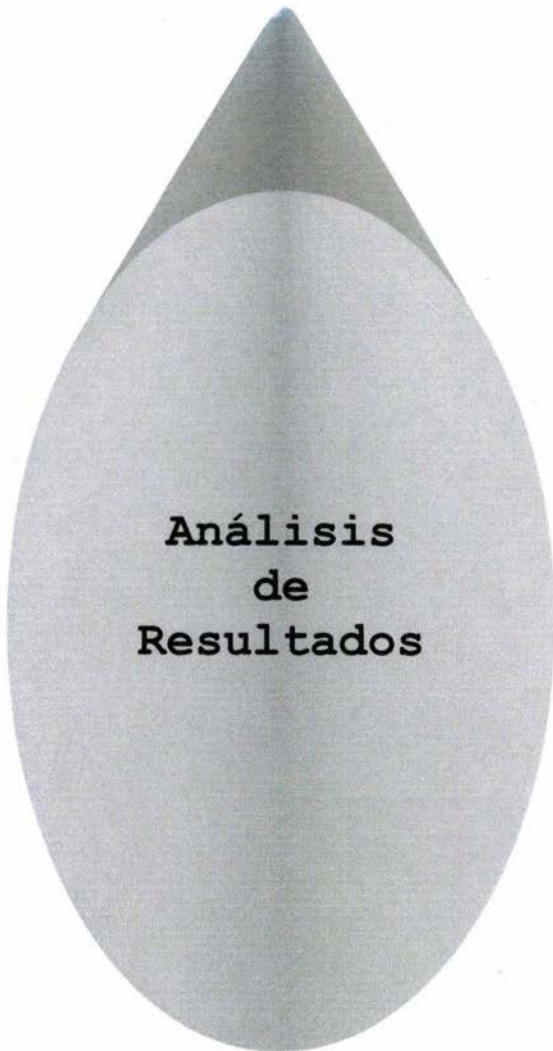
Nivel a estudiar	Condiciones A- B- C+ D+						K3
Concentración	Respuestas a estudiar						
Furazolidona	K	S	N	R	Tr	Ta	Area
50%	0.91	0.65	2185.00	2.87	1.23	4.06	
75%	0.91	0.64	2184.00	2.87	1.22	4.06	
100%	0.91	0.66	2245.00	2.92	1.23	4.06	
125%	0.92	0.66	2312.00	2.98	1.23	4.06	
150%	0.98	0.67	2314.00	2.94	1.27	4.06	
Promedio	0.93	0.66	2248.00	2.92	1.23	4.06	0.9999

Figura 4.19 Cromatograma representativo bajo las condiciones A- B- C+ D+, en donde el segundo pico corresponde a la furazolidona, el tercer pico al Nipagin y el cuarto pico corresponde al Nipasol.





Capítulo V



Análisis de Resultados



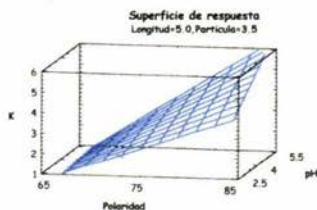
5.1 Ejecución del análisis de resultados.

Recordemos que la robustez es: "el estudio experimental de la influencia de cambios en las condiciones de operación del método analítico, llamado factores a los cambios, sobre las medidas o las respuestas a evaluar". En este capítulo se obtendrá las relaciones de la respuesta y los factores, para así poder entender que pasa con la respuesta al variar los factores, recordando que las respuestas a estudiar son: Factor de capacidad = K' , Número de platos teóricos = N , Simetría = S , Factor de Correlación del área = r^2 , Tiempo de retención = T_r , Resolución = R , y Tiempo de análisis = T_a , para la obtención de gráficas y procesamiento de datos se utilizó el software Statgraphics plus 4.0.

5.2 Análisis del factor de capacidad (K'), para la furazolidona.

La función $Y(A,B,C,D)$ en donde A = Polaridad, B = pH, C = Longitud de columna y D : tamaño de partícula, siendo "Y" el factor de capacidad es representado en la figura 5.2. La "gráfica A" (del lado izquierdo), tenemos el cambio de la respuesta variando la polaridad y el pH, de su valor mínimo al máximo, manteniendo constante el tamaño de partícula y la longitud. Mientras que para la gráfica B tenemos el cambio de la respuesta variando la polaridad y la longitud de la columna, manteniendo constante el pH y el tamaño de partícula, en ambas gráficas podemos apreciar la variación drástica de la respuesta conforme variamos la polaridad, de tal manera que al incrementar la polaridad obtenemos valores mayores del factor de capacidad, nótese el incremento del factor de capacidad al incrementar el pH.

Gráfica A



Gráfica B

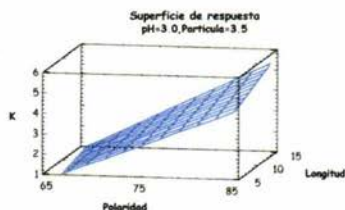


Figura 5.2



5.2.1 Efecto de los factores y las interacciones para K' , correspondiente a la furazolidona.

En la tabla 5.2.1 de efecto estimado para K' , distinguimos que el factor que tiene un fuerte efecto sobre la respuesta es la polaridad, debido a su magnitud mayor, en comparación con el resto de los factores e interacciones. En tanto que la longitud de la columna tiene un menor efecto sobre la respuesta, por lo tanto al variar la polaridad tendremos un cambio más prolongado en la respuesta en comparación con el resto de los factores, otra forma de visualizarlo es observando la figura 5.2.1, en donde notamos que el factor polaridad tiene un mayor efecto. En la tabla también se reportan el efecto de las interacciones considerando que A= polaridad, B= pH, C= Longitud y D= Partícula, apreciamos que la interacción ABC y BC tienen un efecto mayor que el resto de las interacciones.

Factor o interacción	Efecto
A: Polaridad	3.92
B: pH	0.35
C: Longitud	-0.07
D: Partícula	-0.26
AB	0.36
AC	-0.20
AD	-0.33
BC	-0.75
BD	-0.13
CD	-0.39
ABC	-0.76
ABD	-0.15
ACD	-0.30
BCD	-0.21
ABCD	-0.22

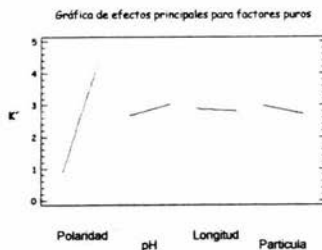


Figura 5.2.1



5.2.2 Análisis de Varianza para K', correspondiente a la furazolidona

Mediante la tabla 5.2.2 y la figura 5.2.2, deducimos que el factor longitud de la columna no es significativo por obtener valores de P mayores a 0.05, en la gráfica lo observamos por que esta por debajo de la línea que representa el valor mínimo del efecto estandarizado para que sea significativo. Lo que nos indica que la variación de los factores: polaridad, pH y Tamaño de partícula son significativos y que el cambio de la respuesta es proporcional a su efecto.

Tabla 5.2.2 Análisis de varianza correspondiente a K'

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Polaridad	184.092	1	184.092	5658.37	0.0000
B:pH	1.48447	1	1.48447	45.63	0.0000
C:Longitud	0.0648454	1	0.0648454	1.99	0.1677
D:Particula	0.840383	1	0.840383	25.83	0.0000
AB	1.57208	1	1.57208	48.32	0.0000
AC	0.487177	1	0.487177	14.97	0.0005
AD	1.33092	1	1.33092	40.91	0.0000
BC	6.73257	1	6.73257	206.94	0.0000
BD	0.215975	1	0.215975	6.64	0.0148
CD	1.82413	1	1.82413	56.07	0.0000
ABC	6.88208	1	6.88208	211.53	0.0000
ABD	0.280335	1	0.280335	8.62	0.0061
ACD	1.0977	1	1.0977	33.74	0.0000
BCD	0.531249	1	0.531249	16.33	0.0003
ABCD	0.583939	1	0.583939	17.95	0.0002
Total error	1.0411	32	0.0325345		
Total (corr.)	209.061	47			

Gráfica de pareto para el factor de capacidad (K')

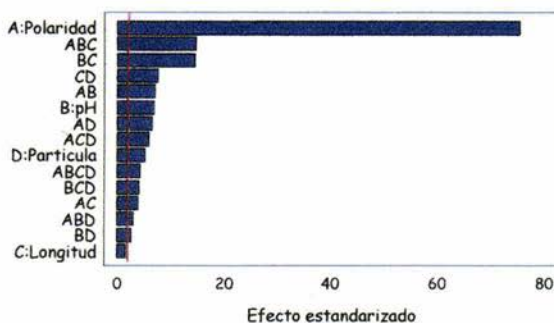


Figura 5.2.2



5.2.3 Representación matemática de la relación factores-respuesta para K'

Mediante la ecuación 5.2.3 puede establecer las relaciones existentes entre los factores y la respuesta, en este caso la letra A= polaridad, B= pH, C= longitud de la columna y D= tamaño de partícula, mientras que "Y" representa el valor del factor de capacidad K'. La aplicación inmediata es predecir el valor de K' al existir la variación de uno de los factores, también se pueden realizar gráficas como las mostradas en la figura 5.2.3, en donde tenemos líneas de contornos para K' obteniéndose al variar la polaridad y el pH, manteniéndose constante la longitud de la columna y el tamaño de la partícula, nótese que solo se esta realizando la variación de la respuesta con factores continuos. En las gráficas puede notar la influencia del factor polaridad, siendo este el que presenta el mayor efecto, por consiguiente el efecto que tiene es que al incrementar la polaridad existe un incremento en K', de igual manera al disminuir la polaridad se obtiene una disminución en el factor de capacidad.

$$Y = -6.57 + 0.10A - 0.64B + 0.05C + 2.74D + 0.01AB + 0.00AC - 0.04AD - 0.26BC - 1.00BD - 0.33CD + 0.00ABC + 0.02ABD + 0.00ACD + 0.15BCD - 0.00ABCD$$

Ecuación 5.2.3

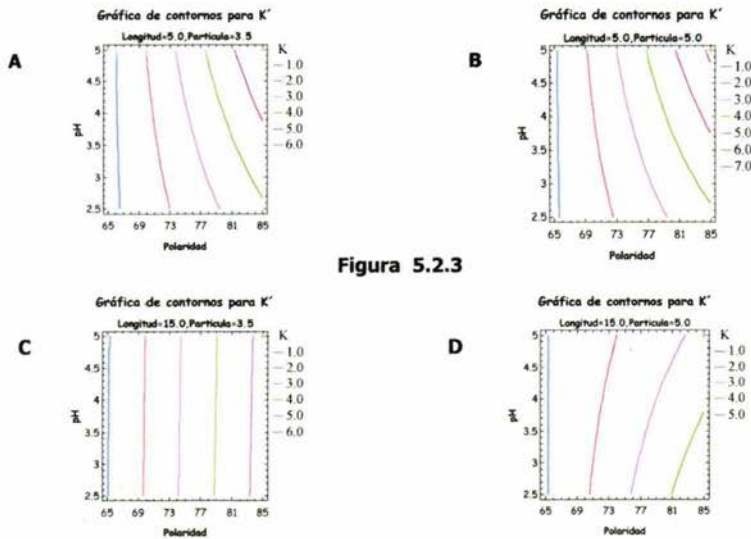


Figura 5.2.3

Falta página

N° 78



5.2.4 Representación gráfica de los modelos para Furazolidona, Nipagin y Nípasol.

Al tener nosotros las gráficas de contornos para la Furazolidona, Nipagin y Nípasol con respecto al factor de capacidad (ver incisos anteriores para las gráficas correspondientes a la furazolidona, mientras que para el nipagin ver anexo 7.2.3 y para el Nípasol ver anexo 7.3.3), podemos traslaparlas. Las líneas de color verde son las correspondientes a la furazolidona, las líneas de color rojo son las correspondientes al nipagin y las líneas azules son las correspondientes al nípasol. La aplicación inmediata es saber que pasa con los valores de las respuestas al estar bajo ciertas condiciones, pero ahora con respecto a los tres compuestos, por ejemplo al diseñar un método cromatográfico se requiere que los métodos de análisis sean cortos, al trabajar nosotros con polaridades bajas que tiene un efecto significativo con respecto a los tres compuestos, obtendríamos factores de capacidad bajos (ver figura 5.2.5, nótese que los valores de K' con baja magnitud de respuesta se encuentren del lado izquierdo, para corroborar el valor aproximado, ver gráficas de contornos correspondiente para cada compuesto, analizado en los incisos anteriores y anexos correspondientes), con esto podemos obtener tiempos de análisis cortos, en adición también sabremos como se comporta con respecto a otras variaciones de factores. Es importante señalar que para los tres compuestos el factor que tiene un gran efecto es la polaridad, en adición tenemos que el tener variaciones muy fuertes de la polaridad obtienen cambios considerables en la magnitud de la respuesta con respecto a los tres compuestos.

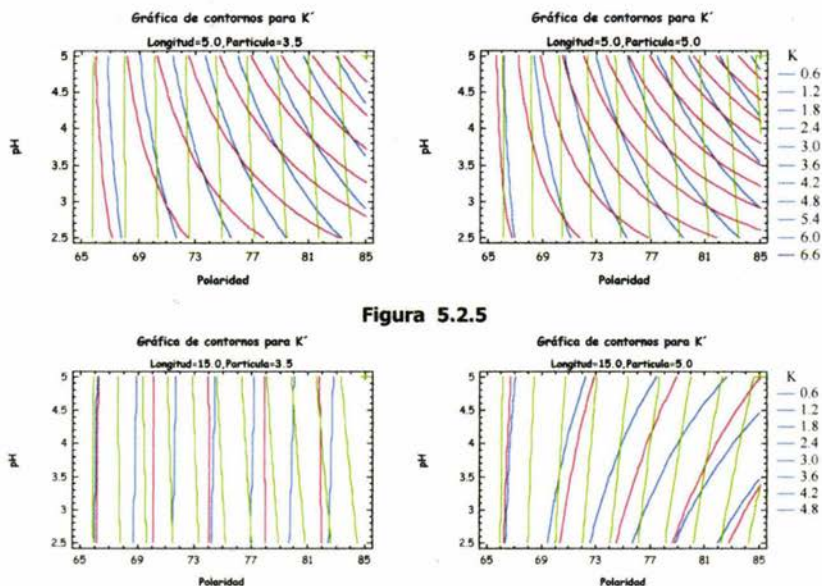


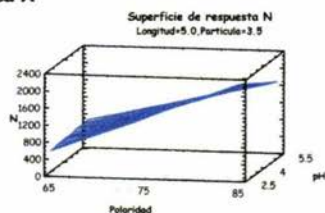
Figura 5.2.5



5.3 Análisis del Número de Platos teóricos para la Furazolidona. (N)

La función Y (A,B,C,D) en donde A= Polaridad, B= pH, C= Longitud de columna y D= tamaño de partícula, siendo "Y" el número de platos teóricos representada en la gráfica de superficie de respuesta en la figura 5.3. Las gráficas de superficie de respuesta para el número de platos teóricos, teniendo la gráfica A (del lado izquierdo) tenemos el cambio de la respuesta variando la polaridad y el pH, de su valor mínimo al máximo, manteniendo constante el tamaño de partícula y la longitud de la columna. Mientras que para la gráfica B tenemos el cambio de la respuesta variando la polaridad y la longitud de la columna, manteniendo constante el pH y el tamaño de partícula, en la gráfica A observamos que al incrementar la polaridad de la fase móvil existe un incremento en el número de platos teóricos, mientras que en la gráfica B apreciamos algo interesante, la polaridad tiene un efecto considerable sobre la respuesta, sin embargo el factor longitud de la columna aparenta tener un efecto más fuerte sobre el número de platos teóricos.

Gráfica A



Gráfica B

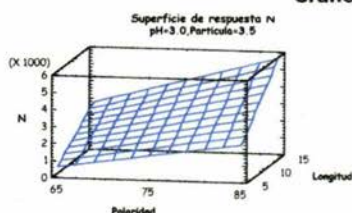


Figura 5.3

5.3.1 Efecto de los factores y las interacciones para N, correspondiente a la furazolidona.

En la tabla 5.3.1 y figura 5.3.1 de efecto estimado para N, encontramos que el pH tiene un efecto pequeño en comparación con el resto de los factores, teniendo este una dirección negativa sobre la respuesta, también encontramos que el tamaño de partícula tiene un efecto considerable, este resultado es de esperarse debido a que el área de superficie se modifica con el tamaño de partícula, esperando mayores número de platos teóricos al tener un tamaño de partícula pequeño, de ahí el sentido negativo que tiene sobre el número de platos teóricos, la polaridad es un factor importante, ya que modifica el número de platos teóricos, corroborándose al tener un efecto grande sobre la respuesta en un sentido positivo, es decir al tener una fase polar favorece el incremento de número de platos teóricos, mientras que la longitud de la columna es el factor que tiene un gran efecto sobre la respuesta, considerando que este factor modifica el área, el factor longitud de la columna tiene un efecto importante dentro de estas condiciones experimentales.

Falta página

N° 81



5.3.2 Análisis de Varianza para N, correspondiente a la furazolidona

Mediante la tabla 5.3.2 y la figura 5.3.2, deducimos que el pH es un factor no significativo por obtener valores de P mayores a 0.05, y en la gráfica lo observamos por que esta por debajo de la línea que representa el valor mínimo del efecto estandarizado para que sea significativo. Lo que nos indica que la variación de los factores: polaridad, Tamaño de partícula y longitud de la columna son significativos y que el cambio de la respuesta es proporcional a su efecto.

Tabla 5.3.2 Análisis de varianza correspondiente a N

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Polaridad	2.39629E7	1	2.39629E7	933.36	0.0000
B:pH	88515.7	1	88515.7	3.45	0.0726
C:Longitud	4.74614E7	1	4.74614E7	1848.64	0.0000
D:Particula	6.2364E6	1	6.2364E6	242.91	0.0000
AB	377144.0	1	377144.0	14.69	0.0006
AC	365761.0	1	365761.0	14.25	0.0007
AD	896738.0	1	896738.0	34.93	0.0000
BC	2.50639E6	1	2.50639E6	97.62	0.0000
BD	2.98519E6	1	2.98519E6	116.27	0.0000
CD	4.98821E6	1	4.98821E6	194.29	0.0000
ABC	3.82728E6	1	3.82728E6	149.07	0.0000
ABD	6.15993E6	1	6.15993E6	239.93	0.0000
ACD	127303.0	1	127303.0	4.96	0.0331
BCD	59027.7	1	59027.7	2.30	0.1393
ABCD	32160.0	1	32160.0	1.25	0.2714
Total error	821558.0	32	25673.7		
Total (corr.)	1.00896E8	47			

Gráfica de pareto para N

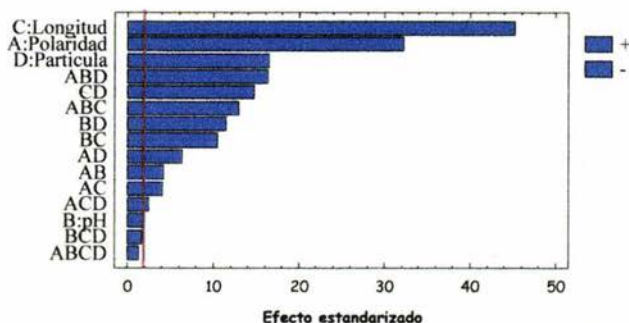


Figura 5.3.2



5.3.3 Representación matemática de la relación factores-respuesta para N'

Mediante la ecuación 5.3.3 puede establecer las relaciones existentes entre los factores y la respuesta, en este caso la letra A= polaridad, B= pH, C= longitud de la columna y D= el tamaño de partícula, mientras que "Y" representa el valor de número de platos. La aplicación inmediata es predecir el valor de N al existir la variación de uno de los factores, también se pueden realizar gráficas como las mostradas en la figura 5.3.3, en donde tenemos líneas de contornos para N obteniéndose al variar la polaridad y el pH, manteniéndose constante la longitud de la columna y el tamaño de la partícula, nótese que solo se está realizando la variación de la respuesta con factores continuos.

$$Y=2278.54+1413.12A-85.89B+1988.75C-720.90D-177.28AB+174.59AC-273.37AD-457.02BC+498.77BD-644.74CD-564.75ABC+716.47ABD-103.00ACD-70.14BCD+51.77ABCD$$

Ecuación 5.3.3

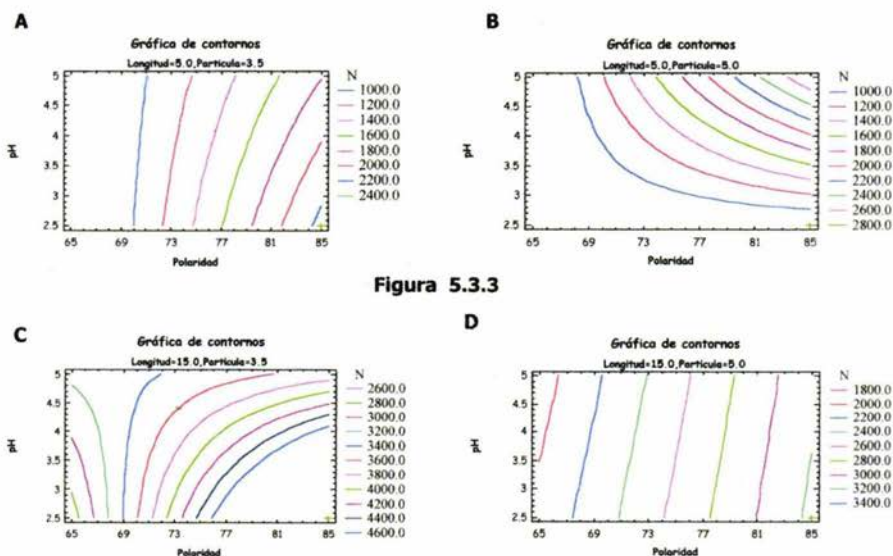


Figura 5.3.3



En las gráficas de contornos pueden apreciar el efecto de los factores, nótese que la polaridad tiene un efecto positivo sobre la magnitud de los platos teóricos, ya que se ve reflejado al incrementar la polaridad de la fase móvil, es decir al tener mayor composición de la fase acuosa. También existe un incremento en el número de platos teórico, al tener un aumento en la longitud de la columna, obsérvese los valores de la grafica A o B, con respecto a la gráfica C y D, mientras que el tamaño de partícula tiene un efecto negativo sobre la respuesta, comparando entre la gráfica D con respecto a la gráfica C, ya que en esta ultima se obtienen valores más pequeños de la respuesta, mientras que para el pH no se observa una tendencia importante sobre la respuesta.

En la figura 5.3.4 se muestran otro tipo de gráficas muy útiles para analizar la respuesta, en las gráficas de cubo podemos observar el cambio que tiene la respuesta, al pasar el factor de su nivel bajo hacia el alto, si tomamos como referencia el vértice del cubo en donde todo los factores se encuentran en su nivel bajo, en este caso se representa como 1, es así que analizamos la tendencia de la respuesta (valor izquierdo), en nuestro estudio para esta respuesta la polaridad y longitud tienen un efecto importante, lo cual lo apreciamos en estas gráficas, nótese que al pasar al nivel alto del factor obtenemos un incremento del número de platos teóricos, en adición anexamos el residual correspondiente a cada vértice (valor derecho), indicando la variación de nuestro sistema al colocarnos en esas condiciones experimentales, por ejemplo en nuestro caso las menores variaciones del sistema las obtenemos al encontrarnos en los vértice B y ABCD (gráfica A,B y C) que pudieran no ser las mejores condiciones de trabajo.

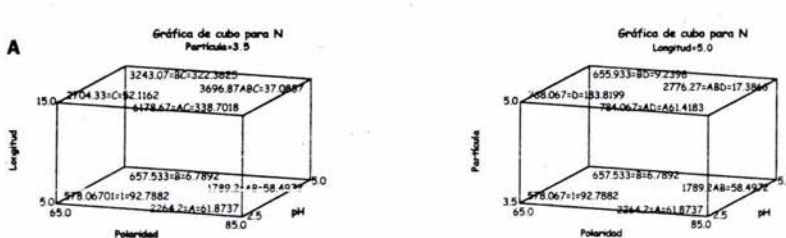


Figura 5.3.4



C



5.3.4 Representación gráfica de los modelos para Furazolidona, Nipagin y Nípasol para N

Al tener nosotros las gráficas de contornos para la Furazolidona, Nipagin y Nípasol con respecto al Número de platos teóricos (ver incisos anteriores con respecto a la furazolidona, mientras que para el nipagin ver anexo 7.4.3, siendo el anexo correspondiente al Nípasol 7.5.3), podemos traslaparlas. Las líneas de color azul son las correspondientes a la furazolidona, las líneas de color rojo son las correspondientes al nipagin y las líneas verdes son las correspondientes al nipasol. La aplicación inmediata es saber que pasa con los valores de las respuestas al estar bajo ciertas condiciones, pero ahora con respecto a los tres compuestos, por ejemplo al diseñar un método cromatográfico se requiere cumplir ciertos requisitos uno de ellos es el tener un valor adecuado de platos teóricos, este es seleccionado bajo el criterio de las condiciones de trabajo optimas, así mismo que dentro de tiempos de análisis cortos, al ver la figura 5.3.5, nótese que los valores de N con baja magnitud de respuesta se encuentran del lado izquierdo, para corroborar el valor aproximado, ver gráficas de contornos correspondiente para cada compuesto, analizado en los incisos anteriores y anexos, con esto podemos obtener tiempos de análisis cortos, en adición también sabremos como se comporta con respecto a otras variaciones de factores. Es importante señalar que para los tres compuestos el factor que tiene un gran efecto es la longitud de la columna, siguiendo la polaridad, sin embargo las diferencias más marcadas uno con respecto a otro compuesto es las que existen entre las influencias de los factores pH y tamaño de partícula, ya que para la nipagin todos son significativos, para la furazolidona solo el pH no es significativo, mientras que el tamaño de partícula lo es para el Nípasol.

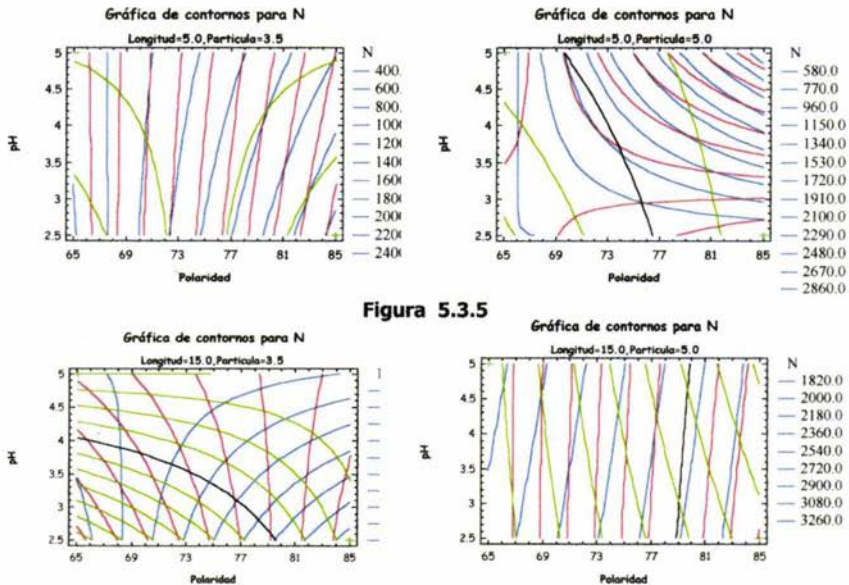


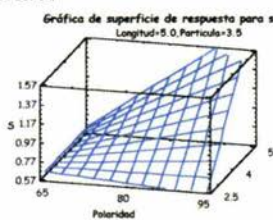
Figura 5.3.5



5.4. Análisis de la simetría para la Furazolidona. (S)

La función $Y(A,B,C,D)$ en donde A = Polaridad, B = pH, C = Longitud de columna y D = tamaño de partícula, siendo "Y" la simetría representada en la gráfica de superficie de respuesta en la figura 5.4. En la gráfica A observamos que la polaridad mantiene la simetría del pico por valores muy bajos, mientras que el pH incrementa de manera drástica el valor de la simetría del pico, sin embargo hay que considerar que los valores óptimos de la simetría se manejan dentro de los rangos de 0.8 y 1.2. Mientras tanto en la gráfica B podemos decir que posiblemente la polaridad no tiene un efecto considerable, ya que parece que el desdoblamiento de la gráfica solo es debido a la longitud de la columna, teniendo este un efecto negativo sobre la respuesta

Gráfica A



Gráfica B

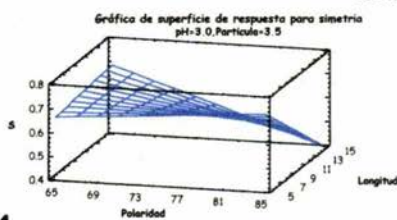


Figura 5.4

5.4.1 Efecto de los factores y las interacciones para S, correspondiente a la furazolidona.

En la tabla 5.4.1 y figura 5.4.1 de efecto estimado para S con respecto a la furazolidona, tenemos que los factores polaridad, pH y tamaño de partícula tienen un efecto positivo sobre la respuesta, mientras que la longitud de la columna tiene un efecto negativo sobre la respuesta, cabe señalar que este es el efecto más grande para la respuesta con respecto a los factores puros e interacción de factores. En la figura 5.4.1 apreciamos que la longitud de la columna es el efecto más grande.



Factor o interacción	Efecto
A: Polaridad	0.10
B: pH	0.05
C: Longitud	-0.18
D: Partícula	0.11
AB	0.11
AC	-0.14
AD	0.07
BC	-0.14
BD	-0.04
CD	0.13
ABC	-0.07
ABD	-0.11
ACD	0.11
BCD	0.14
ABCD	0.63

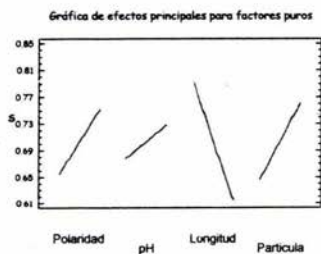


Figura 5.4.1



5.4.2 Análisis de Varianza para S, correspondiente la furazolidona.

Mediante la tabla 5.4.2 y la figura 5.4.2 se muestra que factores o interacción de factores son estadísticamente significativos, mediante este análisis deducimos que todos los factores son estadísticamente significativos, mientras que para la interacción de los factores tenemos que todos son estadísticamente significativos. Señalando que en la figura 5.4.2 se muestra otra forma de visualizar los factores significativos, siendo que están por encima de la línea que representa el valor mínimo para que estos sean significativos.

Table 5.4.2 Analysis of Variance for S - Furazolidona

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Polaridad	0.112182	1	0.112182	155.25	0.0000
B:pH	0.0301753	1	0.0301753	41.76	0.0000
C:Longitud	0.380297	1	0.380297	526.28	0.0000
D:Particula	0.157266	1	0.157266	217.64	0.0000
AB	0.149689	1	0.149689	207.15	0.0000
AC	0.243604	1	0.243604	337.12	0.0000
AD	0.0651582	1	0.0651582	90.17	0.0000
BC	0.230811	1	0.230811	319.41	0.0000
BD	0.0157144	1	0.0157144	21.75	0.0001
CD	0.210079	1	0.210079	290.72	0.0000
ABC	0.0562728	1	0.0562728	77.87	0.0000
ABD	0.149578	1	0.149578	207.00	0.0000
ACD	0.143938	1	0.143938	199.19	0.0000
BCD	0.230672	1	0.230672	319.22	0.0000
ABCD	0.0479119	1	0.0479119	66.30	0.0000
Total error	0.0231235	32	0.000722609		
Total (corr.)	2.24647	47			

Gráfica de pareto para la simetría

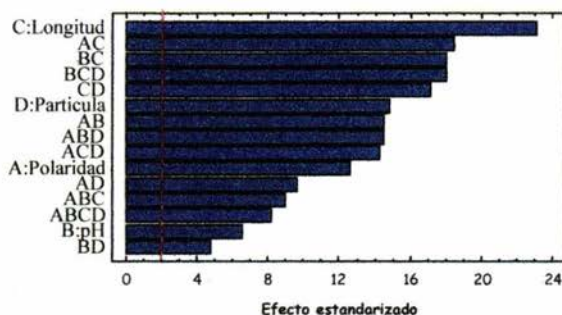


Figura 5.4.2



5.4.3 Representación matemática de la relación factores-respuesta para "S"

Mediante la ecuación 5.4.3 puede establecer las relaciones existentes entre los factores y la respuesta, en este caso la letra A= polaridad, B= pH, C= longitud de la columna y D= el tamaño de partícula, mientras que "Y" representa el valor de la simetría. La aplicación inmediata es predecir el valor de S al existir la variación de uno de los factores, también se pueden realizar gráficas como las mostradas en la figura 5.4.3, en donde tenemos líneas de contornos para S obteniéndose al variar la polaridad y el pH, manteniéndose constante la longitud de la columna y el tamaño de la partícula, nótese que solo se está realizando la variación de la respuesta con factores continuos.

$$Y=11.60-0.18A-3.953B-0.20C-2.32D+0.06AB+0.01AC+0.04AD+0.18BC+0.78BD+0.04CD-0.00ABC-0.01ABD-0.00ACD-0.04BCD+0.00ABCD$$

Ecuación 5.4.3

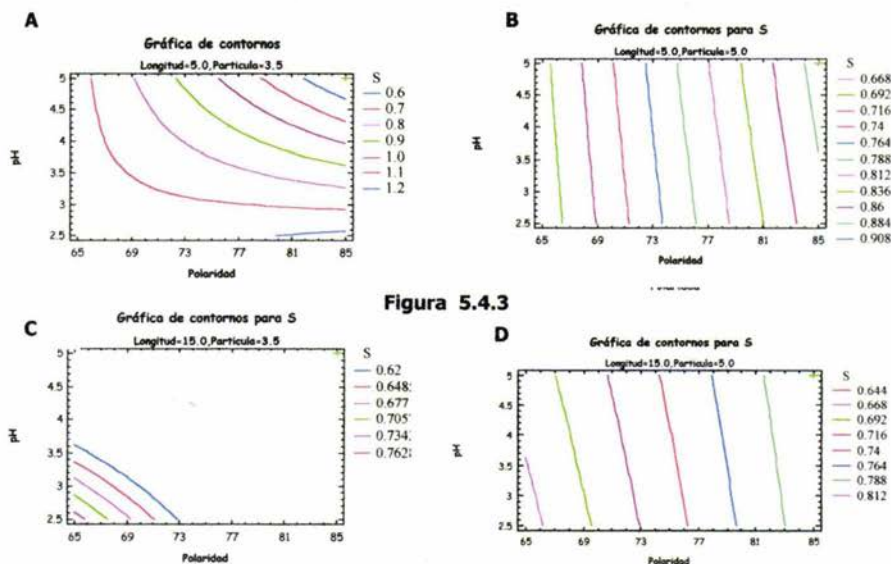


Figura 5.4.3



En la gráfica A de la figura 5.4.3 notamos que el pH tiene un efecto considerable sobre la respuesta, ya que conforme disminuimos el valor del pH obtenemos incrementos en la respuesta, mientras que para la polaridad se observa poco cambio en el valor de la respuesta, nótese que se encuentran paralelas las líneas de contorno y casi se puede obtener cualquier valor de ellas. En la gráfica B aparece todo lo contrario a la gráfica A, es decir que la influencia de poner un tamaño de partícula grande, obtiene el cambio del valor de la simetría conforme variamos el valor de la polaridad, nótese que al incrementar el valor de la polaridad se obtiene un incremento en los valores de la simetría En la gráfica C tenemos una mayor influencia del resto de los factores esto por la mayor deflexión de las líneas de contornos, y por ultimo tenemos que la gráfica D tiene un comportamiento muy parecido a la gráfica B, es decir el cambio del valor de la simetría conforme el cambio de la polaridad.

En la figura 5.4.4 se muestran otro tipo de gráficas muy útiles para analizar la respuesta, en las gráficas de cubo podemos observar el cambio que tiene la respuesta, al pasar el factor de su nivel bajo hacia el alto, si tomamos como referencia el vértice del cubo en donde todos los factores se encuentran en su nivel bajo, en este caso se representa como 1. El valor del lado izquierdo representa el valor de la respuesta al posicionarnos en ese vértice, mientras que el lado derecho representa la variación del sistema al ejecutarse en esas condiciones experimentales, por lo tanto notamos que al colocarnos en los vértices ABCD, ACD, AD y ABD obtenemos buenas condiciones de trabajo con respecto a la respuesta, mientras que para ABCD y ABD tenemos buenas condiciones de trabajo tanto para respuesta y variabilidad, considerando que los valores apropiados de simetría son entre 0.8 y 1.2.

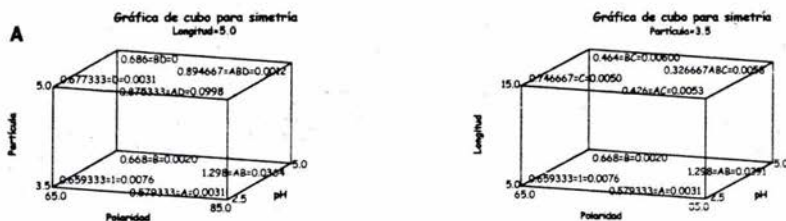


Figura 5.4.4

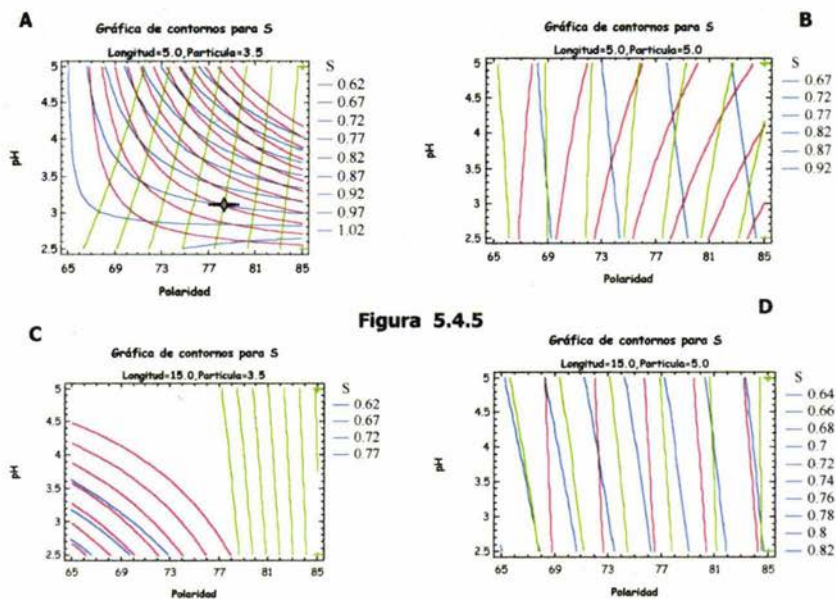


C



5.4.4 Representación gráfica de los modelos para Furazolidona, Nipagin y Nípasol para S

Al tener nosotros las gráficas de contornos para la furazolidona, nipagin y nípasol con respecto a la simetría (ver incisos anteriores con respecto a la furazolidona y para el nipagin ver anexo 7.6.3, mientras que para el nípasol se encuentran en el anexo 7.7.3), podemos traslaparlas. Las líneas de color azul son las correspondientes a la furazolidona, las líneas de color rojo son las correspondientes al Nipagin y las líneas verdes son las correspondientes al Nípasol. Al tener este tipo de graficas nos da información de cómo esta variando nuestra respuesta en función de los factores, pero ahora considerando los tres compuestos, es un hecho que en la cromatografía una de las respuestas que presenta problemas es la simetría, conociendo que factores influyen más sobre la respuesta se podrá resolver este problema indicando bajo que condiciones se podrá encantar el valor de la respuesta deseada o una aproximación del valor, considerando que no siempre se puede obtener todo, por ejemplo en la figura 5.4.5 se encuentra el comportamiento de la respuesta simetría bajo las condiciones de trabajo, el punto señalado con la estrella representa las condiciones necesarias para obtener una simetría aproximadamente de 0.8 para los tres compuestos, siendo una respuesta adecuada, considerando que este parámetro debe encontrarse entre 0.8 y 1, nótese que no en todas las graficas se puede encontrar la respuesta deseada.

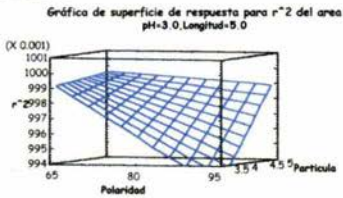




5.5 Análisis r^2 correspondiente a la furazolidona

La función $Y(A,B,C,D)$ en donde $A=$ Polaridad, $B=$ pH, $C=$ Longitud de columna y $D=$ tamaño de partícula, siendo "Y" el factor determinación (r^2) para la furazolidona. En la figura 5.5 se muestra graficas de superficie de respuesta, nótese que en ambas graficas la variación corresponde a milésimas y dentro de un rango confiable, sin embargo nos podemos encontrar con lineamientos rigurosos, nótese el decremento de la respuesta al incrementar la polaridad.

Gráfica A



Gráfica B

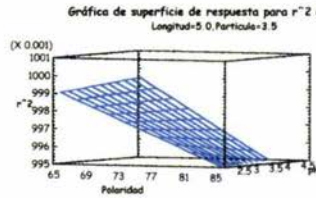


Figura 5.5

5.5.1 Efecto de los factores y las interacciones para r^2 , correspondiente a la Furazolidona.

En la tabla 5.5.1 y figura 5.5.1 de efecto estimado para r^2 con respecto a la furazolidona, observamos que los factores y grupo de interacción de factores no tienen un efecto muy grande sobre la respuesta, esto se puede apreciar en los valores pequeños que tienen sus efectos, sin embargo notamos que el efecto más grande es el correspondiente al tamaño de partícula, y el factor con el efecto más pequeño es la longitud,

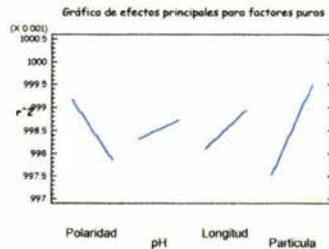


Figura 5.5.1



Tabla 5.5.1-Efecto estimado para r^2

Factor o interacción	Efecto
A: Polaridad	-0.0013
B: pH	0.0004
C: Longitud	0.0008
D: Partícula	0.0020
AB	-0.0002
AC	-0.0014
AD	0.0010
BC	0.0006
BD	-0.0001
CD	-0.0005
ABC	0.0002
ABD	0.0003
ACD	-0.0012
BCD	-0.0003
ABCD	-0.0000

5.5.2 Análisis de Varianza para r^2 área, correspondiente a la furazolidona.

Mediante la tabla 5.5.2 y la figura 5.5.2 se muestra que factores o interacción de factores son estadísticamente significativos, mediante este análisis deducimos que los factores polaridad y tamaño de partícula son significativos, siendo el pH y la longitud factores estadísticamente no significativo, esto ya se elucidaba por los valor pequeño de su efecto. Mientras que en la figura 5.5.2 se muestra otra forma de visualizar los factores significativos, siendo que están por encima de la línea que representa el valor mínimo para que estos sean significativos.

Table 5.5.2 Analysis of Variance for r^2 - Furazolidona

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Polaridad	0.0000206719	1	0.0000206719	4.26	0.0471
B:pH	0.00000204188	1	0.00000204188	0.42	0.5210
C:Longitud	0.00000825021	1	0.00000825021	1.70	0.2013
D:Particula	0.0000470052	1	0.0000470052	9.70	0.0039
AB	6.30208E-7	1	6.30208E-7	0.13	0.7208
AC	0.0000225502	1	0.0000225502	4.65	0.0386
AD	0.0000109252	1	0.0000109252	2.25	0.1431
BC	0.00000475021	1	0.00000475021	0.98	0.3297
BD	2.26875E-7	1	2.26875E-7	0.05	0.8301
CD	0.00000368521	1	0.00000368521	0.76	0.3898
ABC	5.00208E-7	1	5.00208E-7	0.10	0.7501
ABD	0.00000136688	1	0.00000136688	0.28	0.5991
ACD	0.0000181302	1	0.0000181302	3.74	0.0620
BCD	9.91875E-7	1	9.91875E-7	0.20	0.6541
ABCD	4.6875E-8	1	4.6875E-8	0.01	0.9223
Total error	0.000155127	32	0.00000484771		
Total (corr.)	0.0002969	47			

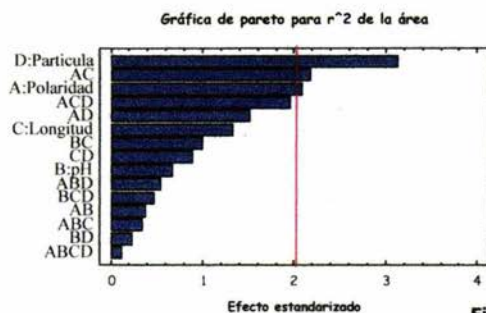


Figura 5.5.2

5.5.3 Representación matemática de la relación factores-respuesta para r^2 .

Mediante la ecuación 5.5.3 puede establecer las relaciones existentes entre los factores y la respuesta, en este caso la letra A= polaridad, B= pH, C= longitud de la columna y D= tamaño de partícula, mientras que "Y" representa el valor de r^2 . La aplicación inmediata es predecir el valor de r^2 al existir la variación de uno de los factores, también se pueden realizar gráficas como las mostradas en la figura 5.5.3

$$Y=1.04-0.00A+0.01B-0.01C-0.01D-0.00AB+0.00AC+0.00AD-0.00BC-0.00BD+0.00CD+0.00ABC+0.00ABD-0.00ACD+0.00BCD-0.00ABCD$$

Ecuación 5.5.3

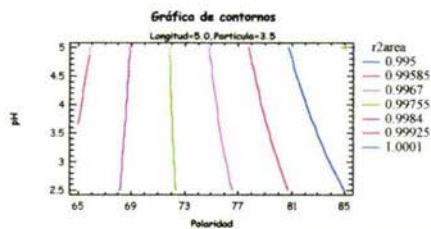


Figura 5.5.3



En la figura 5.5.4 se muestran otro tipo de gráficas muy útiles para analizar la respuesta, en las gráficas de cubo podemos observar el cambio que tiene la respuesta, al pasar el factor de su nivel bajo hacia el alto, si tomamos como referencia el vértice del cubo en donde todo los factores se encuentran en su nivel bajo, en este caso se representa como 1. El valor del lado izquierdo representa el valor de la respuesta al posicionarnos en ese vértice, mientras que el lado derecho representa la variación del sistema al ejecutarse en esas condiciones experimentales, por lo tanto notamos que para esta respuesta existe poca variación y con un buen valor de respuesta, podemos decir que la respuesta es robusta frente a los factores, cabe señalar que para el tamaño de partícula se ve influenciada de cierta manera.

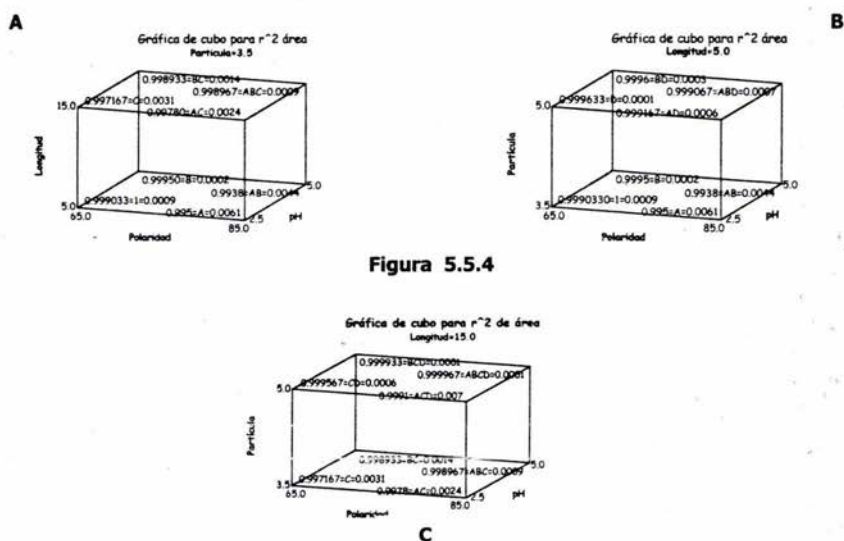


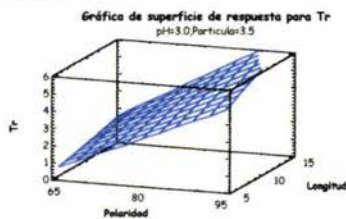
Figura 5.5.4



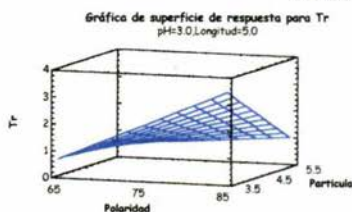
5.6 Análisis del tiempo de retención (T_r), para la furazolidona.

La función $Y(A,B,C,D)$ en donde $A=$ Polaridad, $B=$ pH, $C=$ Longitud de columna y $D=$ tamaño de partícula, siendo "Y" el tiempo de retención es representado en la figura 5.6. El tiempo de retención es una de las respuestas importantes dentro de cromatografía, sin embargo esta es una de las respuestas que se ve afectada por mayor medida, por un gran número de factores, en la gráfica A observamos el comportamiento de la respuesta en función de la polaridad y la longitud de la columna, notando que el incremento de la polaridad trae consigo un incremento en el tiempo de retención y que se vera aún mayor al aumentar la longitud de la columna, mientras que en la gráfica B apreciamos no-solo el incremento de la respuesta con la polaridad, se nota que la aumento del tamaño de partícula conlleva a un decremento en la respuesta, así mismo observamos que el pH tiene un efecto positivo sobre la respuesta, nótese en la grafica C.

Gráfica A



Gráfica B



Gráfica C

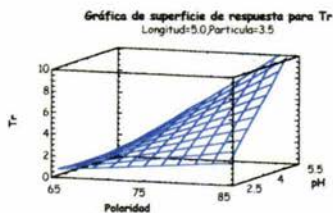


Figura 5.6



5.6.1 Efecto de los factores y las interacciones para Tr, correspondiente a la furazolidona.

En la tabla 5.6.1 de efecto estimado para Tr, distinguimos que el factor que tiene un fuerte efecto sobre la respuesta es la polaridad, debido a su magnitud mayor, en comparación con el resto de los factores e interacciones. En tanto que la longitud de la columna y el pH tiene un menor efecto sobre la respuesta en un sentido positivo, mientras que el tamaño de partícula tiene un efecto negativo sobre la respuesta, otra forma de visualizarlo es observando la figura 5.6.1, en donde notamos que el factor Polaridad tiene un mayor efecto, note también la pendiente en relación con la dirección de la respuesta.

Factor o interacción	Efecto
A: Polaridad	2.98
B: pH	0.92
C: Longitud	0.73
D: Partícula	-1.40
AB	0.93
AC	-0.11
AD	-1.11
BC	-1.10
BD	-0.73
CD	0.54
ABC	-1.10
ABD	-0.75
ACD	0.71
BCD	0.92
ABCD	0.91

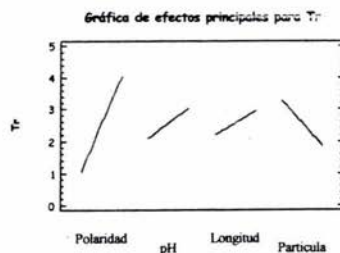


Figura 5.6.1



5.6.2 Análisis de Varianza para Tr, correspondiente a la furazolidona

Mediante la tabla 5.6.2 y la figura 5.6.2, deducimos que todos los factores son significativos, teniendo mayor relevancia la polaridad y el tamaño de partícula, al igual que todos las interacción de los factores tiene una influencia estadística sobre la respuesta.

Tabla 5.6.2 Análisis de varianza correspondiente a Tr

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Polaridad	106.908	1	106.908	9294.26	0.0000
B:pH	10.1374	1	10.1374	881.31	0.0000
C:Longitud	6.47131	1	6.47131	562.60	0.0000
D:Partícula	23.4421	1	23.4421	2037.98	0.0000
AB	10.2981	1	10.2981	895.29	0.0000
AC	0.139677	1	0.139677	12.14	0.0015
AD	14.9139	1	14.9139	1296.57	0.0000
BC	14.3812	1	14.3812	1250.26	0.0000
BD	6.36789	1	6.36789	553.61	0.0000
CD	3.43518	1	3.43518	298.64	0.0000
ABC	14.5835	1	14.5835	1267.85	0.0000
ABD	6.70395	1	6.70395	582.82	0.0000
ACD	6.10663	1	6.10663	530.89	0.0000
BCD	10.0911	1	10.0911	877.29	0.0000
ABCD	9.93529	1	9.93529	863.74	0.0000
blocks	0.0139176	2	0.00695882	0.60	0.5526
Total error	0.345078	30	0.0115026		
Total (corr.)	244.274	47			

Gráfica de pareto para el Tr

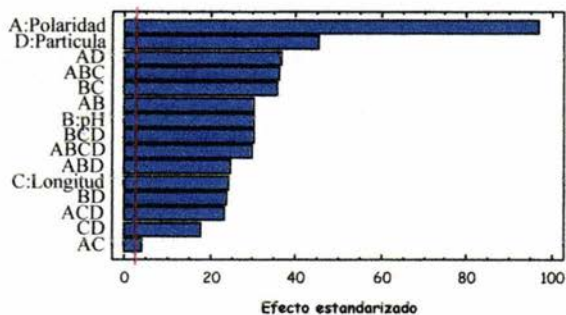


Figura 5.6.2



5.6.3 Representación matemática de la relación factores-respuesta para Tr

Mediante la ecuación 5.6.3 puede establecer las relaciones existentes entre los factores y la respuesta, en este caso la letra A= polaridad, B= pH, C= longitud de la columna y D= tamaño de partícula, mientras que "Y" representa el valor que puede tener Tr. La utilidad de este tipo de ecuaciones es poder indicar el valor del tiempo de retención bajo ciertas condiciones, teniendo la posibilidad de establecer un tiempo de retención para un mejor comportamiento del método. En la figura 5.6.3 apreciamos las gráficas de contornos para la furazolidona, variando la polaridad y el pH de la fase móvil, manteniendo constante los factores no continuos, apréciase que se obtienen tiempos más cortos al utilizar una longitud de columna más corta, así mismo el incremento de la polaridad, nos conlleva a tiempos de retención más largos.

$$Y=115.24-1.77A-45.99B-9.31C-22.32D+0.71AB+0.15AC+0.34AD+3.25BC+8.90BD+1.72CD-0.05ABC-0.14ABD-0.03ACD-0.63BCD+0.01ABCD$$

Ecuación 5.6.3

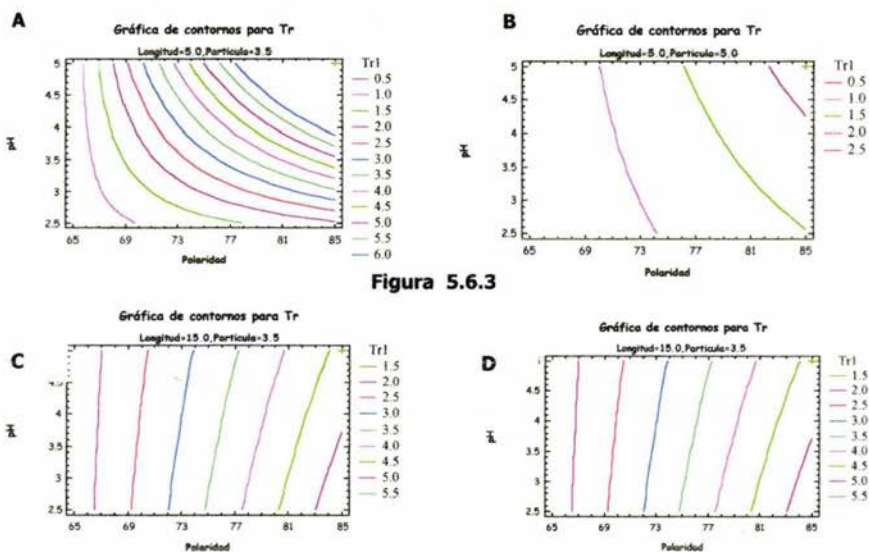


Figura 5.6.3



En la figura 5.6.4 se muestran otro tipo de gráficas muy útiles para analizar la respuesta, en las gráficas de cubo podemos observar el cambio que tiene la respuesta, al pasar el factor de su nivel bajo hacia el alto, si tomamos como referencia el vértice del cubo en donde todos los factores se encuentran en su nivel bajo, en este caso se representa como 1, es así que analizamos la tendencia de la respuesta (valor izquierdo), en nuestro estudio para esta respuesta la polaridad tienen un efecto importante, lo cual lo apreciamos en estas gráficas, nótese que al pasar al nivel alto del factor obtenemos un incremento del tiempo de retención, en adición anexamos el residual correspondiente a cada vértice (valor derecho), indicándonos la variación de nuestro sistema, ya que dentro de los métodos cromatográficos es conveniente que exista poca variación en el tiempo de retención.

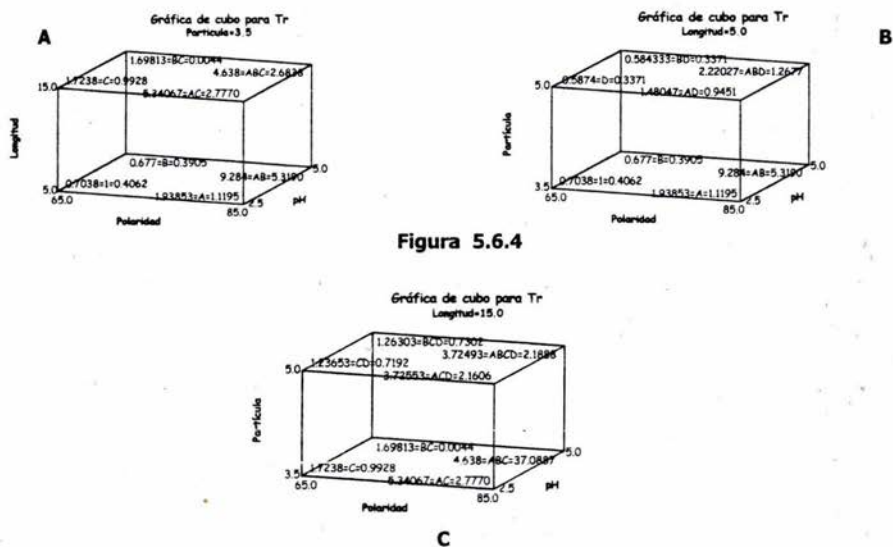
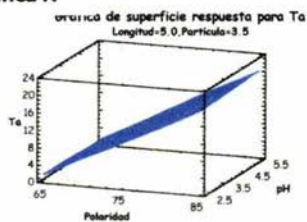
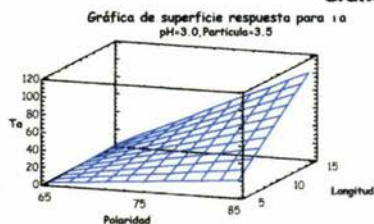
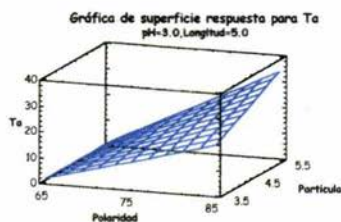


Figura 5.6.4



5.7 Análisis del tiempo de análisis o tiempo de retención para el Nipasol (Ta).

En la figura 5.7 se muestran las graficas de superficie de respuesta correspondientes al tiempo de retención del Nipasol, o de manera análoga al tiempo de análisis, corresponde al ultimo compuesto en eluir de la columna, independiente que el tiempo de retención es una respuesta importante, siendo el ultimo tiempo de retención cobra un valor extra, ya que nos confiere el tiempo de análisis de la corrida cromatografica, es preferente tener un tiempo corto. El analizar las gráficas observamos un comportamiento similar a la furazolidona, en la "grafica A" nos podemos percatar que el incremento en la polaridad nos conlleva a tener tiempos de análisis más largos, así mismo observamos que el pH no conlleva a cambios drásticos en la respuesta, mientras que en la "gráfica B" notamos no solo la influencia de la polaridad sobre la respuesta, ya que también nos indica que la longitud de la columna es un parámetro importante, ya que el utilizar columnas largas nos llevara a tener corridas cromatográficas más largas. Analizando la "gráfica C" podemos percibirnos que el tamaño de partícula juega un papel importante en el incremento o disminución de la respuesta, indicando la gráfica que el incremento en el tiempo de análisis será aun mayor al utilizar longitudes de columna largas y tamaño de partícula pequeña.

Gráfica A**Gráfica B****Gráfica C****Figura 5.7**



5.7.1 Efecto de los factores y las interacciones para T_a .

En la tabla 5.7.1 observamos el efecto y tendencia de los factores sobre la respuesta, como era de esperarse la polaridad representa el factor con mayor efecto y teniendo una dirección positiva sobre la respuesta, mientras que para el factor longitud de la columna tiene un efecto positivo, con respecto al tamaño de partícula tenemos un efecto pequeño, pero con una dirección negativa sobre la respuesta, entre tanto que para el factor pH se tienen un efecto muy pequeño con sentido negativo sobre la respuesta, otra forma de visualizarlo es mediante la figura 5.7.1.

Factor o interacción	Efecto
A: Polaridad	53.25
B: pH	-0.09
C: Longitud	32.86
D: Partícula	-4.92
AB	-0.07
AC	29.71
AD	-4.18
BC	-0.63
BD	-1.83
CD	-10.60
ABC	-0.63
ABD	-1.88
ACD	-9.73
BCD	-1.95
ABCD	-1.97

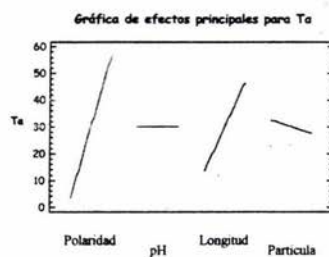


Figura 5.7.1



5.7.2 Análisis de Varianza para Ta.

Hasta este momento sabemos cual es el efecto que tienen los factores sobre la respuesta, pero mediante la tabla 5.7.2 y la figura 5.7.2 apreciaremos cual factores son estadísticamente significativos, de ahí deducimos que la polaridad, longitud de la columna y tamaño de partícula son estadísticamente significativas, mientras que para el pH no lo es.

Tabla 5.7.2 Análisis de varianza correspondiente a Ta

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Polaridad	34020.6	1	34020.6	27055.63	0.0000
B:pH	0.0914991	1	0.0914991	0.07	0.7892
C:Longitud	12953.9	1	12953.9	10301.88	0.0000
D:Particula	290.367	1	290.367	230.92	0.0000
AB	0.0556445	1	0.0556445	0.04	0.8348
AC	10594.4	1	10594.4	8425.44	0.0000
AD	209.72	1	209.72	166.78	0.0000
BC	4.72715	1	4.72715	3.76	0.0620
BD	40.0239	1	40.0239	31.83	0.0000
CD	1349.56	1	1349.56	1073.26	0.0000
ABC	4.69169	1	4.69169	3.73	0.0629
ABD	42.637	1	42.637	33.91	0.0000
ACD	1136.21	1	1136.21	903.59	0.0000
BCD	45.493	1	45.493	36.18	0.0000
ABCD	46.4139	1	46.4139	36.91	0.0000
blocks	0.391103	2	0.195551	0.16	0.8567
Total error	37.723	30	1.25743		
Total (corr.)	60777.1	47			

Gráfica de pareto para Ta

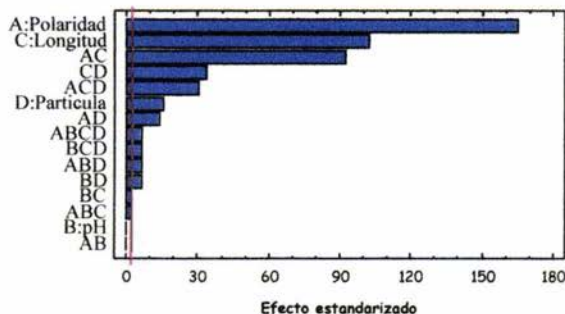


Figura 5.7.2



5.7.3 Representación matemática de la relación factores-respuesta para Ta

Mediante la ecuación 5.7.3 puede establecer las relaciones existentes entre los factores y la respuesta, en este caso la letra A= polaridad, B= pH, C= longitud de la columna y D= el tamaño de partícula, mientras que "Y" representa el valor que puede tener Ta. Al tener la ecuación podemos decir el valor que toma "Y" al variar A, B, C y D, así mismo podemos construir gráficas de contornos, en donde podemos apreciar el comportamiento de la respuesta bajo el campo de estudio, se encuentran en la figura 5.7.3, en las gráficas podemos apreciar la fuerte influencia que tiene la polaridad sobre la respuesta, debido a que la línea de repuesta cambia conforme nos movemos del valor del efecto, nótese también el efecto de la longitud de la columna, con columna pequeña tiempos de análisis más cortos.

$$Y=197.38-3.07A-27.06B-33.80C-38.95D-0.42AB+0.53AC+0.61AD-5.48BC-7.09BD+3.20CD+0.08ABC+0.11ABD-0.05ACD +1.37BCD-0.02ABCD$$

Ecuación 5.7.3

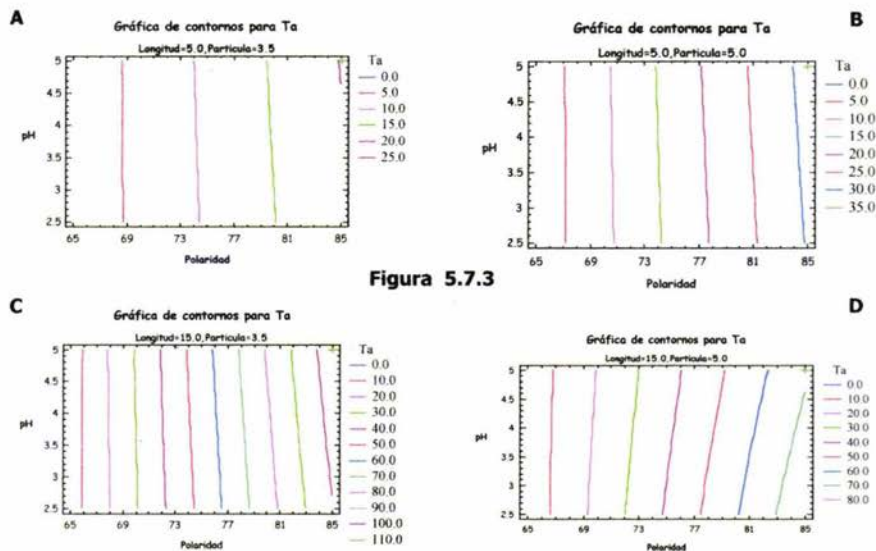
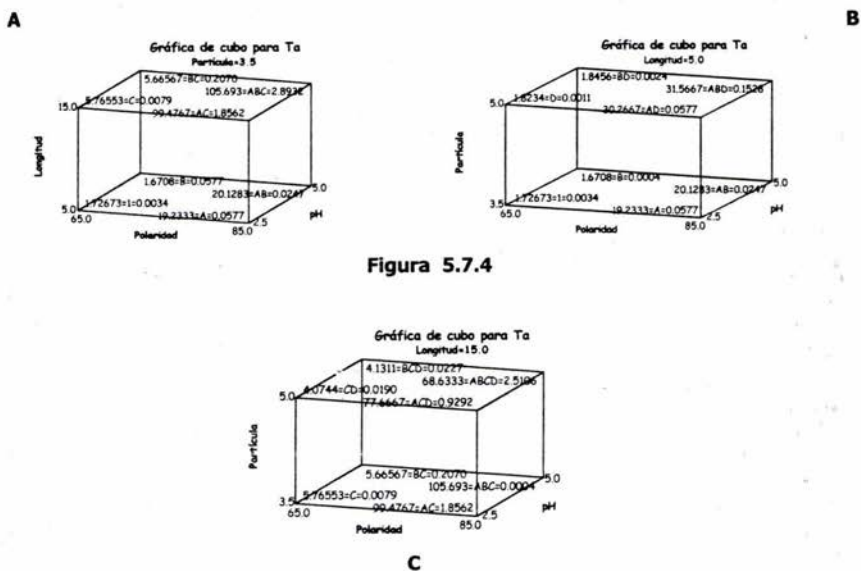


Figura 5.7.3



En la figura 5.7.4 se muestran las gráficas de cubo correspondiente al tiempo de retención del Nípasol o tiempo de análisis, podemos observar el cambio que tiene la respuesta, al pasar el factor de su nivel bajo hacia el alto, si tomamos como referencia el vértice del cubo en donde todos los factores se encuentran en su nivel bajo, en este caso se representa como 1, es así que analizamos la tendencia de la respuesta (valor izquierdo), nótese el incremento de respuesta por la polaridad y longitud de la columna, sin embargo mediante el cubo podemos identificar el área deseada de trabajo, ya que lo preferente es tener tiempos de análisis cortos por ejemplo los puntos C, AC, BC, CD y BCD, evitando el resto de las áreas en donde se encuentran tiempos de análisis largos (cubo A), hay que considerar que no se puede escoger la respuesta sin tomar en cuenta otros parámetros.

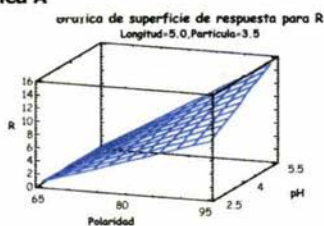




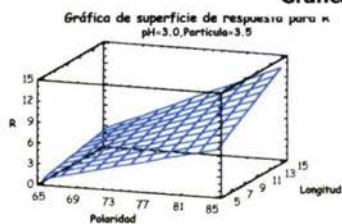
5.8 Análisis de la resolución entre la furazolidona y el nipagín.

En la figura 5.8 se muestra las gráficas de superficie de respuesta correspondiente a la resolución entre la furazolidona y el nipagín, cabe señalar que desde los puntos teóricos de la cromatografía una resolución mayor de 1.6 es suficiente, sin embargo para los órganos oficiales se pide una resolución mínimo de 2 o 3, por consiguiente el valor óptimo de resolución dependerá para quien este dirigido el método analítico, mientras tanto el incremento de la polaridad y el pH, conllevan a un incremento en la resolución (gráfica A), mientras que la longitud de columna tiene un efecto positivo sobre la respuesta (gráfica B), entretanto el factor tamaño de partícula tiene un efecto positivo sobre la respuesta (gráfica C).

Gráfica A



Gráfica B



Gráfica C

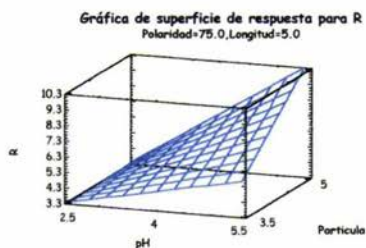


Figura 5.8



5.8.1 Efecto de los factores y las interacciones para R

Hasta este momento tenemos una idea de cómo se comportan los factores sobre la respuesta, sin embargo mediante la tabla 5.8.1, nos percataremos sobre la magnitud del efecto sobre la resolución, de ella decimos que la polaridad es el factor con la mayor magnitud, siguiendo por grado de importancia tenemos a la longitud de la columna y al pH, teniendo como el factor más pequeño al tamaño de partícula, note que algunas interacciones de factores tienen un efecto negativo sobre la respuesta. Otra forma de visualizarlo es mediante la figura 5.8.1.

Factor o interacción	Efecto
A: Polaridad	8.95
B: pH	1.72
C: Longitud	2.15
D: Partícula	0.61
AB	1.64
AC	0.36
AD	0.44
BC	-2.00
BD	1.06
CD	-1.58
ABC	-2.09
ABD	1.23
ACD	-1.02
BCD	-0.87
ABCD	-0.74

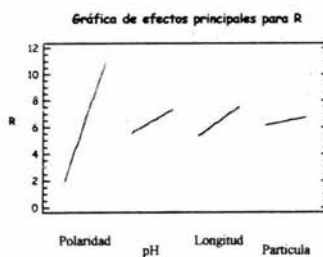


Figura 5.8.1



5.8.2 Análisis de Varianza para R

Hasta este momento sabemos cual es el efecto que tienen los factores sobre la respuesta, pero mediante la tabla 5.8.2 y la figura 5.8.2 apreciaremos cual factor es estadísticamente significativo, de ahí deducimos que todos los factores son estadísticamente significativos, al igual que sus interacciones.

Tabla 5.8.2 Análisis de varianza correspondiente a R

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Polaridad	960.629	1	960.629	13742.56	0.0000
B:pH	35.5056	1	35.5056	507.94	0.0000
C:Longitud	55.4253	1	55.4253	792.90	0.0000
D:Particula	4.43038	1	4.43038	63.38	0.0000
AB	32.1985	1	32.1985	460.63	0.0000
AC	1.51543	1	1.51543	21.68	0.0001
AD	2.28691	1	2.28691	32.72	0.0000
BC	48.0024	1	48.0024	686.71	0.0000
BD	13.563	1	13.563	194.03	0.0000
CD	29.7757	1	29.7757	425.97	0.0000
ABC	52.2727	1	52.2727	747.80	0.0000
ABD	18.1361	1	18.1361	259.45	0.0000
ACD	12.4021	1	12.4021	177.42	0.0000
BCD	9.1742	1	9.1742	131.24	0.0000
ABCD	6.57949	1	6.57949	94.12	0.0000
Total error	2.23685	32	0.0699017		
Total (corr.)	1284.13	47			

Gráfica de Pareto para R

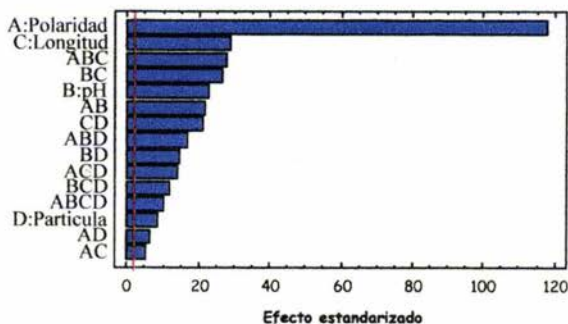


Figura 5.8.2



5.8.3 Representación matemática de la relación factores-respuesta para R

Mediante la ecuación 5.8.3 puede establecer las relaciones existentes entre los factores y la respuesta, en este caso la letra A= la polaridad, B= pH, C= longitud de la columna y D= el tamaño de partícula, mientras que "Y" representa el valor que puede tener R, así mismo podemos construir gráficas de contornos como las mostradas en la figura 5.8.3, que nos ayuda a visualizar el comportamiento de la respuesta, algo que nos podemos percatar es las líneas de respuesta se mueven conforme variamos la polaridad, debido a su efecto importante que tienen, dando la deflexión de las líneas de respuesta por los otros factores, nótese también que mediante columnas pequeñas se pueden obtener buenas resoluciones así mismo que tiempos de análisis más cortos.

$$Y = -76.84 + 1.14A + 24.55B + 0.38C + 25.19D - 0.38AB - 0.00AC - 0.38D - 1.03BC - 9.34BD - 1.07CD + 0.02ABC + 0.14ABD - 0.02ACD + 0.50BCD - 0.01ABCD$$

Ecuación 5.8.3

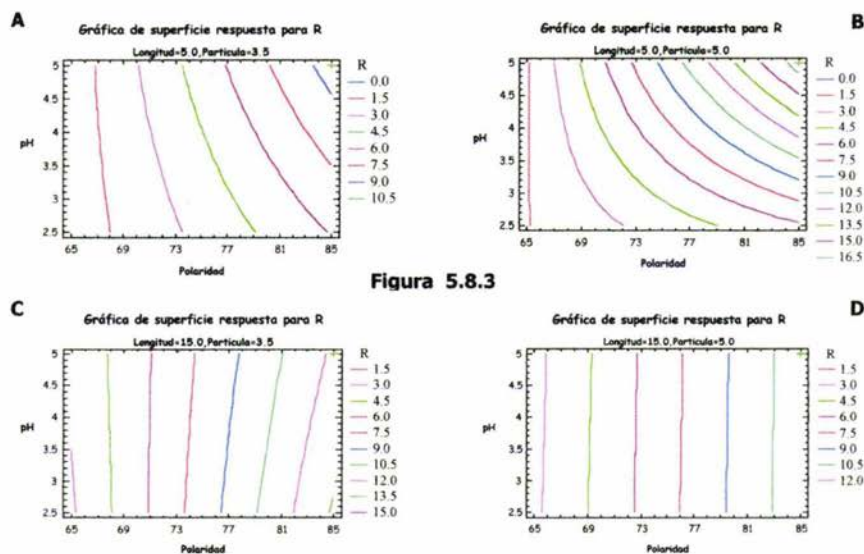


Figura 5.8.3



Otro tipo de gráficas muy útiles son las mostradas en la figura 5.8.4, llamadas de cubo, nótese el incremento del valor de la respuesta al pasar del valor bajo al alto, con respecto a la polaridad, longitud, pH y tamaño de partícula (valor derecho), mientras que el valor del lado izquierdo representa la variación de nuestro sistema en esos puntos, con estas gráficas podemos indicar las posibles áreas de trabajo, por ejemplo A, AB, C, BC, CD, BCD, ACD y ABCD, se pueden encontrar valores adecuados de resolución, el discriminar un área con respecto a la otra dependerá de la variabilidad, tiempo de análisis, factor de capacidad, simetría, entre otros criterios para definir el área de trabajo óptimo.

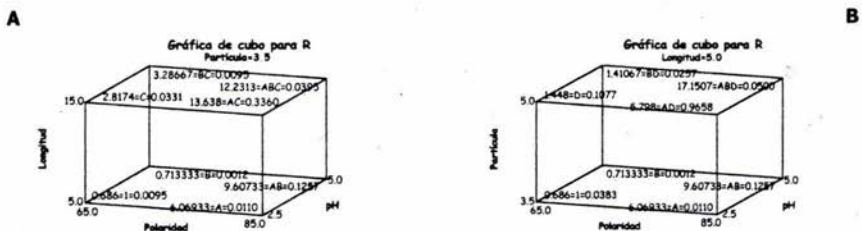
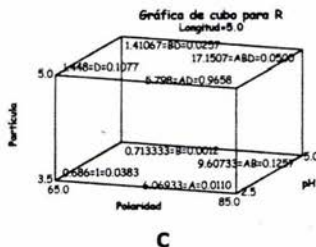


Figura 5.8.4





5.9 Combinación de respuestas

Una de las ventajas que conlleva la realización de este tipo de diseños experimentales es que se pueden mejorar los métodos analíticos, ya que para la optimización no se lleva a cabo mediante el ensayo prueba-error, más bien el conocer el comportamiento de los factores sobre las respuestas nos traslada a obtener un mejor entendimiento de nuestro método, esto mediante la ayuda de gráficas y ecuaciones que nos permitan saber el comportamiento de la respuesta bajo ciertas condiciones de trabajo, en nuestro caso el método original tiene un tiempo de análisis de aproximadamente de 18 minutos.

En los métodos cromatográficos el tener tiempos cortos es lo deseado, sin embargo para poder decidir que valor de respuesta se toma, hay que considerar en cuenta otras respuestas, es decir el elegir tiempos de análisis cortos nos conlleva a la posibilidad de tener resoluciones no adecuadas, esto de nada serviría, sin embargo mediante la combinación de respuestas podemos cumplir ambas características de la mejor manera, aunque hay que tener en cuenta que no siempre se puede obtener lo mejor de todo, es decir se puede obtener el mejoramiento de una respuesta a costa de otra o en mejor de los casos a ambas. En la figura 5.9 se muestra el traslape de dos respuestas (Gráfica C), debido a la combinación del tiempo de análisis (gráfica A) con la resolución (gráfica B), mediante esta forma podemos señalar bajo que condiciones de trabajo puede encontrar la coexistencia de ambas respuestas, encontrado el punto en nuestro caso se esperarían tiempos de análisis de 9 minutos con una resolución aproximada de 3 (Punto señalado con una carita), para esto se proponen una composición de fase acuosa del 73 %, con un valor de pH de 4.3 y una longitud de columna de 5 cm con un tamaño de partícula de 3.5 μm .

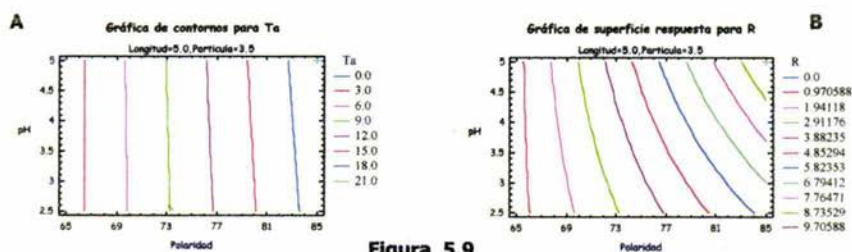
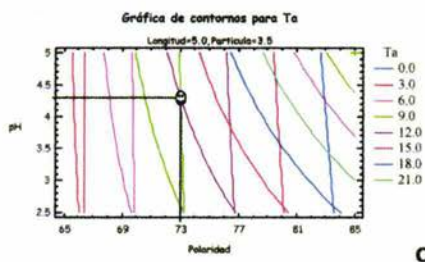


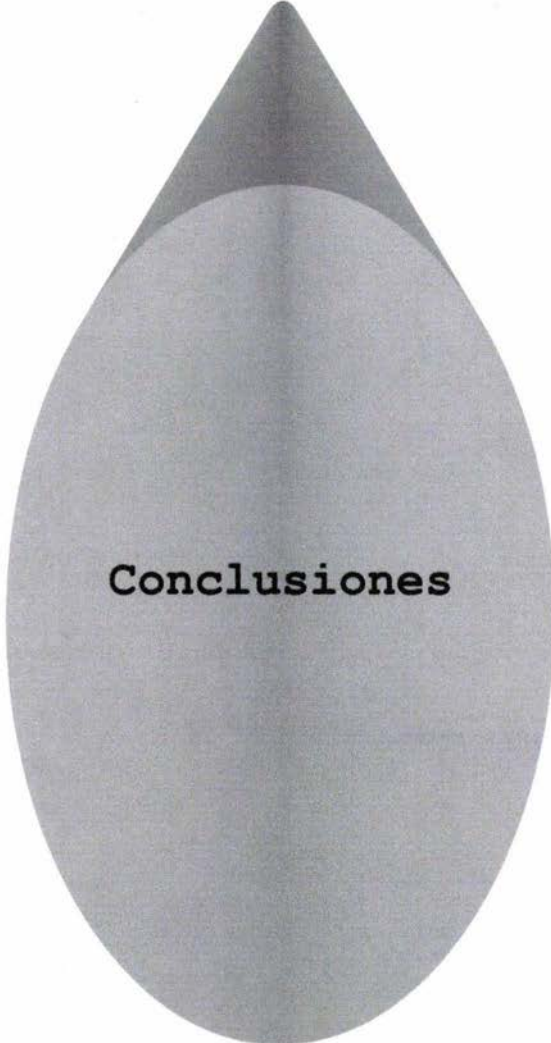
Figura 5.9



C



Capitulo VI

A large, dark gray teardrop-shaped graphic that tapers to a point at the top. Inside this shape, the word "Conclusiones" is written in a bold, black, monospaced font.

Conclusiones



El estudio de los factores sobre la respuesta se realizó mediante el diseño de experimentos, con el cual se llegó:

- I. Respuesta factor de capacidad (K'): El factor que tiene mayor efecto sobre la respuesta es la polaridad, teniendo un incremento sobre la respuesta, el segundo factor de importancia es el pH teniendo un efecto positivo, mientras que el tamaño de partícula y la longitud de la columna, tienen un efecto negativo sobre la respuesta, de los cuales la polaridad, pH y tamaño de partícula son estadísticamente significativos, la relación respuesta-factores e interacciones está dada por la ecuación 5.2.3.

- II. Respuesta Platos teóricos (N): El factor que tiene mayor efecto sobre la respuesta es la longitud de la columna, teniendo un incremento sobre la respuesta, mientras tanto la polaridad es el segundo factor de importancia, este tiene un efecto positivo sobre la respuesta, mientras que el pH y el tamaño de partícula tienen un efecto negativo sobre la respuesta, de los cuales la polaridad, longitud y el tamaño de partícula son estadísticamente significativos, la relación respuesta-factores e interacciones está dada por la ecuación 5.3.3.

- III. Respuesta Simetría (S): El factor que tiene mayor efecto sobre la respuesta es la longitud de la columna seguido del tamaño de partícula, ambos con una dirección negativa sobre la respuesta, mientras tanto la polaridad y el pH nos conllevan a provocar decrementos de la respuesta, de los cuales la polaridad, pH, longitud de la columna y tamaño de partícula son estadísticamente significativos, la relación respuesta factores e interacciones está dada por la ecuación 5.4.3.

- IV. Factor determinación r^2 : El factor que tiene mayor efecto sobre la respuesta es el tamaño de partícula con un efecto positivo sobre la respuesta, en adición es el único factor estadísticamente significativo, es importante señalar que el efecto sobre la respuesta es pequeño en comparación con otras respuestas, la relación respuesta-factores e interacciones está dada por la ecuación 5.5.3.

- V. Tiempo de Retención (T_r): El factor que tiene mayor efecto sobre la respuesta es la polaridad, teniendo un incremento sobre la respuesta, mientras que la longitud se encuentra como el segundo factor en importancia con un efecto positivo sobre la respuesta, al igual que el factor pH, mientras que el tamaño de partícula tiene un efecto negativo sobre la respuesta de los cuales todos los factores son estadísticamente significativos, la relación respuesta-factores e interacciones está dada por la ecuación 5.6.3.



- VI. Tiempo de análisis (T_a): El factor que tiene mayor efecto sobre la respuesta es la polaridad, teniendo un incremento sobre la respuesta, mientras que la longitud se encuentra como el segundo factor en importancia con un efecto positivo sobre la respuesta, mientras que el tamaño de partícula y el pH tiene un efecto negativo sobre la respuesta de los cuales solo la polaridad, longitud de la columna y tamaño de partícula son estadísticamente significativos, la relación respuesta-factores e interacciones esta dada por la ecuación 5.7.3.
- VII. Resolución R: El factor que tiene mayor efecto sobre la respuesta es la polaridad, teniendo un efecto positivo sobre la respuesta, así como la longitud de la columna, tamaño de partícula y pH, de igual manera estos factores son estadísticamente significativos al igual que sus interacciones, la ecuación que muestra la relación entre respuesta-Factores e interacciones esta dada por la ecuación 5.8.3.

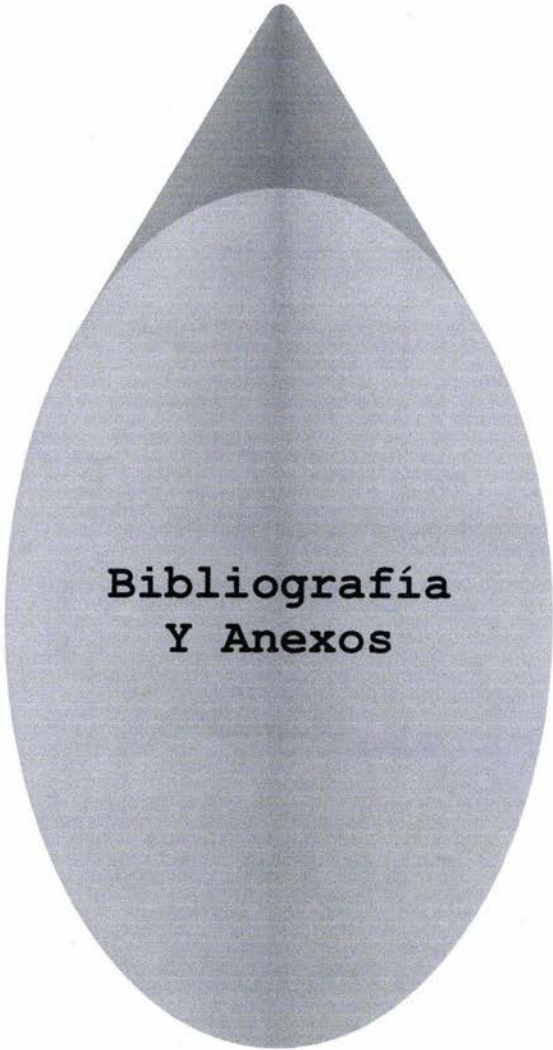
Se concluye que fijando los factores no continuos, es decir el tamaño de partícula y la longitud de la columna dentro del subproceso y teniendo un buen control sobre los factores pH y polaridad, en especial la polaridad, ya que este tiene un efecto considerable sobre las respuestas directas se tiene un subproceso de medición robusto y las variaciones de las respuestas serán mínimas por variables relacionadas al no-proceso, mientras tanto los factores seleccionados tuvieron efectos importantes sobre la respuesta como era de esperarse desde un inicio.

El ejecutar el estudio de robustez nos conlleva a conocer la variabilidad de las respuestas como se mostró en las graficas de cubo, el conocer que factores son significativos nos ayuda a prevenir problemas y a resolverlos en un futuro. Otra ventaja que se tiene es la reducción del tiempo de análisis, considerando la respuesta critica resolución como se indico en el inciso 5.9, que por consiguiente se logra un menor gasto de solventes, tiempo hombre, utilización de equipo entre otros. El tener el estudio de robustez con respecto a la furazolidona nos apuntala al desarrollo de otra técnica, ya que el tener los estudios de los parámetros de retención, nos ayudara a establecer el tiempo de elusión de la furazolidona y así discriminar a otros compuestos relacionados a su descomposición, metabolitos o excipientes.

El logro de la alta calidad y bajo costo es un componente esencial en cualquier proceso, el diseño de experimentos es una herramienta útil para mejorar la calidad, con la aplicación de los métodos de diseño de experimentos a través del ciclo del proceso puede tenerse: la identificación de los factores clave, optimizar el diseño del proceso, optimizar el proceso, resolver problemas en el proceso, reducir costos de inspección en el proceso, acelerar el proceso y reducción de costos totales.



Capítulo VII



**Bibliografía
Y Anexos**

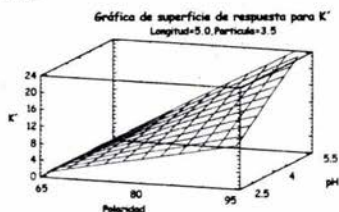


7.1 Anexos correspondiente al análisis de respuestas para Nípasol y Nipagin

7.2 Análisis del factor de capacidad (K'), para la Nipagin.

La función $Y(A,B,C,D)$ en donde A: es Polaridad, B: pH, C: Longitud de columna y D: tamaño de partícula, siendo "Y" el factor de capacidad para el nipagin es representado en la figura 7.2. La gráfica A (del lado izquierdo) tenemos el cambio de la respuesta variando la polaridad y el pH, manteniendo constante el tamaño de partícula y la longitud. Mientras que para la gráfica B (del lado derecho) tenemos el cambio de la respuesta variando la polaridad y la longitud de la columna, manteniendo constante el pH y el tamaño de partícula. Analizando las gráficas observamos que el factor que tiene un fuerte efecto sobre la respuesta es la polaridad, la variación del pH de su valor mínimo al máximo tiene un incremento en la respuesta, esto se aprecia en la gráfica A, mientras que la longitud de la columna da la impresión de no tener un cambio prolongado sobre la respuesta en la gráfica B.

Gráfica A



Gráfica B

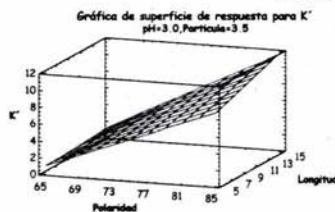


Figura 7.2

7.2.1 Efecto de los factores y las interacciones para K' , correspondiente al Nipagin.

En la tabla 7.2.1 se muestran los efectos calculados para K' y podemos notar que la polaridad tiene el efecto más grande sobre la respuesta en una dirección positiva, seguido del pH y la longitud de la columna, siendo el más débil de los factores el tamaño de partícula: Podemos notar que este compuesto tiene un comportamiento parecido a la furazolidona, ya que en ambos se ven afectados fuertemente por la polaridad. Otra forma de visualizar la magnitud de los efectos es mediante la figura 7.2.1 en esta podemos observar que las líneas representan la magnitud del efecto, por ende decimos que la polaridad tiene un efecto más grande sobre la respuesta. En la tabla 7.2.1 podemos apreciar de igual manera el efecto que tienen las interacciones sobre la respuesta, y encontramos que la interacción ABC, BC y AB representan el efecto más alto sobre el factor de K' .



Factor o interacción	Efecto
A: Polaridad	11.2516
B: pH	2.7997
C: Longitud	-1.80384
D: Partícula	1.1376
AB	2.8071
AC	-2.093
AD	0.9802
BC	-3.5516
BD	0.63337
CD	-2.2053
ABC	-3.5591
ABD	0.6147
ACD	-2.0305
BCD	-1.4195
ABCD	-1.4296

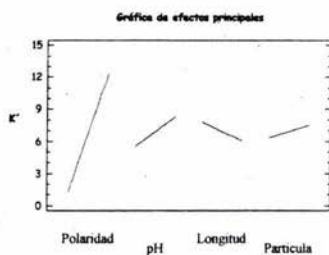


Figura 7.2.1

7.2.2 Análisis de Varianza para K', correspondiente al Nipagín

Asta este momento sabe el efecto que tienen los factores sobre la respuesta pero no sabemos si estos son significativos, para esto realizamos nuestro análisis de varianza mostrado en la tabla 7.2.2, en donde obtenemos que todos los factores son estadísticamente significativos, mientras que para las interacciones obtenemos que estos también son estadísticamente significativos por obtener valores de P menores a 0.05. En la figura 7.2.2 podemos apreciar el efecto estandarizado de los factores, y notamos que todos los factores e interacciones están por arriba de la línea azul, esta representa el valor mínimo del efecto estandarizado para que sea significativo.

Tabla 7.2.2 Análisis de varianza correspondiente a K'

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Polaridad	1519.18	1	1519.18	10213.26	0.0000
B:pH	94.0622	1	94.0622	632.37	0.0000
C:Longitud	39.0459	1	39.0459	262.50	0.0000
D:Particula	16.3594	1	16.3594	109.98	0.0000
AB	94.5576	1	94.5576	635.70	0.0000
AC	52.5677	1	52.5677	353.41	0.0000
AD	11.5303	1	11.5303	77.52	0.0000
BC	151.374	1	151.374	1017.67	0.0000
BD	4.81957	1	4.81957	32.40	0.0000
CD	58.3607	1	58.3607	392.35	0.0000
ABC	152.01	1	152.01	1021.95	0.0000
ABD	4.5351	1	4.5351	30.49	0.0000
ACD	49.4763	1	49.4763	332.62	0.0000
BCD	24.1797	1	24.1797	162.56	0.0000
ABCD	24.5274	1	24.5274	164.90	0.0000
Total error	4.75985	32	0.148745		
Total (corr.)	2301.34	47			

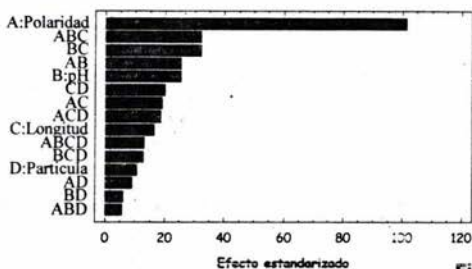
Gráfica de pareto para K' 

Figura 7.2.2

7.2.3 Representación matemática de la relación factores-respuesta para K'

Mediante la ecuación 7.2.3 podemos establecer las relaciones existentes entre los factores y la respuesta, en este caso la letra A: representa la polaridad, B: pH, C: longitud de la columna y D: el tamaño de partícula, mientras que "Y" representa el valor del factor de capacidad K' . La aplicación inmediata es predecir el valor de K' al existir la variación de uno de los factores, también se pueden realizar gráficas como las mostradas en la figura 7.2.3, en donde tenemos líneas de contornos para K' obteniéndose al variar la polaridad y el pH, manteniéndose constante la longitud de la columna y el tamaño de la partícula, nótese que solo se está realizando la variación de la respuesta con factores continuos.



En las gráficas puede notar la influencia del factor polaridad, siendo este el que presenta el mayor efecto, por consiguiente el efecto que tiene al incrementar la polaridad existe un incremento en el K' , de igual manera al disminuir la polaridad se obtiene una disminución en el factor de capacidad.

$$Y = -53.0004 + 0.8078A + 25.3731B + 2.8819C + 23.6783D - 0.3904AB - 0.04213AC - 0.3587AD - 2.3660BC - 12.0442BD - 1.9847CD + 0.0363ABC + 0.1853ABD + 0.0301ACD + 0.9923BCD - 0.0152ABCD$$

Ecuación 7.2.3

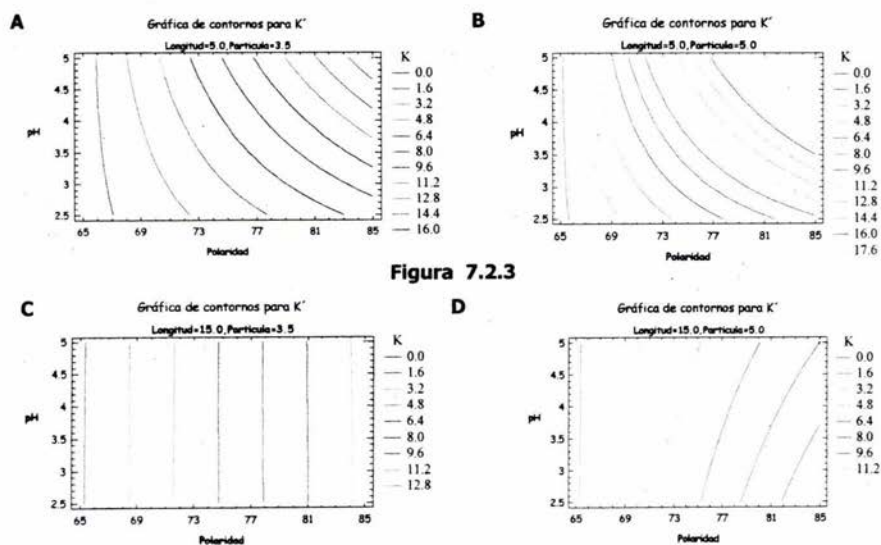


Figura 7.2.3

En la figura 7.2.4 se muestran otro tipo de gráficas muy útiles para analizar la respuesta, en las gráficas de cubo podemos observar el cambio que tiene la respuesta, si tomamos como referencia el vértice del cubo en donde todos los factores se encuentran en su nivel bajo, en este caso se representa como 1, es así que analizamos la tendencia de la respuesta (valor izquierdo), en nuestro estudio para esta respuesta la polaridad tienen un efecto importante, lo cual lo apreciamos en estas gráficas, nótese que al pasar al nivel alto del factor obtenemos un incremento del factor de capacidad.



El valor del lado izquierdo que se encuentra en cada vértice del cubo, representa el valor del residual, este nos indica la variabilidad que se presenta en esas condiciones de tal manera que al ejecutar una corrida experimental teniendo A-, B-, C+ y D- obtiene la menor variabilidad en la respuesta, en este caso representa 0.0012 que se encuentra en el cubo A y C de la figura 7.2.4. Este tipo de análisis de la respuesta no solo nos permite percatarnos del incremento o disminución de la respuesta, sino también de la variabilidad que podamos obtener al movernos bajo diferentes condiciones.

A



B

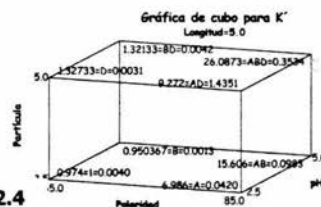
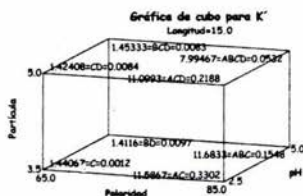


Figura 7.2.4



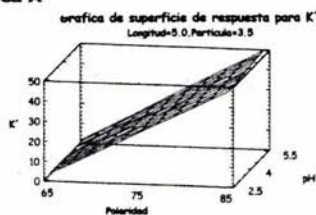
C



7.3 Análisis del factor de capacidad (K'), para la Nípasol.

La función $Y(A,B,C,D)$ en donde A: es Polaridad, B: pH, C: Longitud de columna y D: tamaño de partícula, siendo "Y" el factor de capacidad para el Nípasol es representado en la figura 7.3. La gráfica A de superficie de respuesta para el factor de capacidad del Nípasol se observa el cambio de respuesta al variar la polaridad y el pH, mientras que para la gráfica B tenemos la superficie de respuesta de K' al variar la polaridad y la longitud de la columna. Analizando la gráfica A podemos distinguir que la polaridad sigue siendo un factor importante, y no es de sorprenderse ya que la relación estructural de los compuestos es semejante; nótese que al incrementar la polaridad observamos un incremento en la respuesta, en tanto que el pH no parece tener un cambio drástico sobre la respuesta. Mientras que para la gráfica B tenemos que ahora notamos que la longitud de la columna es un factor importante, entendiendo que el compuesto es más a fin a la fase estacionaria, es comprensible que al incrementar la longitud de la columna el compuesto estará más tiempo en la fase estacionaria.

Gráfica A



Gráfica B

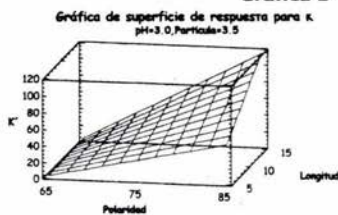


Figura 7.3

7.3.1 Efecto de los factores y las interacciones para K' , correspondiente a la Nípasol.

En la tabla 7.3.1 se tienen el efecto de los factores e interacciones de nuestro diseño experimental, la tabla nos muestra que la polaridad tiene el efecto más grande con respecto a los otros factores, teniendo a la longitud de columna como el segundo factor más importante, ambos con una dirección positiva sobre la respuesta, mientras que el pH tiene un efecto pequeño sobre la respuesta, lo que nos indica que al tener variación en el pH este no afectará a la respuesta en una gran medida, nótese también que la interacción CD y ACD tienen un efecto considerable, pero este tiene con una dirección negativa de la respuesta. Otra forma de visualizar la magnitud del efecto que tiene el factor es mediante la Figura 7.3.1, se aprecia que la polaridad tiene el efecto más grande.



Factor o interacción	Efecto
A: Polaridad	85.9398
B: pH	0.17487
C: Longitud	17.2435
D: Partícula	8.57831
AB	0.111797
AC	15.9715
AD	7.76835
BC	-1.4235
BD	-2.16136
CD	-17.8434
ABC	-1.47317
ABD	-2.15697
ACD	-17.0
BCD	-2.67236
ABCD	-2.6093

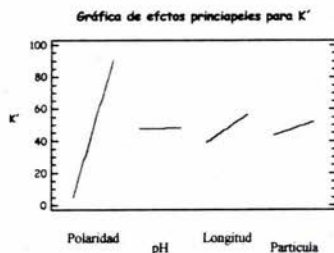


Figura 7.3.1

7.3.2 Análisis de Varianza para K' , correspondiente al Nípasol.

El análisis de varianza nos permite saber cuáles factores o grupo de interacciones son estadísticamente significativos, el análisis es mostrado en la tabla 7.3.2, en la tabla apreciamos que la polaridad es un factor significativo al igual que el tamaño de partícula y la longitud, mientras que para el pH este no resulta ser estadísticamente significativo al igual que la interacción AB. En la figura 7.3.2 podemos apreciar el efecto estandarizado de los factores, y notamos los factores e interacciones que están por arriba de la línea azul, esta representa el valor mínimo del efecto estandarizado para que sea significativo.

Tabla 7.3.2 Análisis de varianza correspondiente a K'

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Polaridad	88627.8	1	88627.8	47535.39	0.0000
B:pH	0.366953	1	0.366953	0.20	0.6605
C:Longitud	3568.07	1	3568.07	1913.73	0.0000
D:Partícula	883.05	1	883.05	473.62	0.0000
AB	0.149982	1	0.149982	0.08	0.7786
AC	3061.06	1	3061.06	1641.80	0.0000
AD	724.168	1	724.168	388.41	0.0000
BC	24.3161	1	24.3161	13.04	0.0011
BD	56.0579	1	56.0579	30.07	0.0000
CD	3820.62	1	3820.62	2049.19	0.0000
ABC	26.0428	1	26.0428	13.97	0.0008
ABD	55.8302	1	55.8302	29.94	0.0000
ACD	3467.99	1	3467.99	1860.05	0.0000
BCD	85.6983	1	85.6983	45.96	0.0000
ABCD	81.7016	1	81.7016	43.82	0.0000
blocks	0.361016	2	0.180508	0.10	0.908
Total error	55.9338	30	1.86446		
Total (corr.)	104539.0	47			

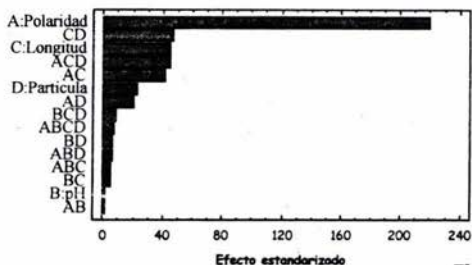
Gráfica de pareto para K' 

Figura 7.3.2

7.3.3 Representación matemática de la relación factores-respuesta para K'

Mediante la ecuación 7.3.3 podemos establecer las relaciones existentes entre los factores y la respuesta, en este caso la letra A: representa la polaridad, B: pH, C: longitud de la columna y D: el tamaño de partícula, mientras que "Y" representa el valor del factor de capacidad K' . La aplicación inmediata es predecir el valor de K' al existir la variación de uno de los factores, también se pueden realizar gráficas como las mostradas en la figura 7.3.3, en donde tenemos líneas de contornos para K' obteniéndose al variar la polaridad y el pH, manteniéndose constante la longitud de la columna y el tamaño de la partícula, nótese que solo se está realizando la variación de la respuesta con factores continuos.



En las gráficas puede notar la influencia del factor polaridad, siendo este el que presenta el mayor efecto, por consiguiente el efecto que tiene es que al incrementar la polaridad existe un incremento en el K' , de igual manera al disminuir la polaridad se obtiene una disminución en el factor de capacidad, en adición el efecto de la longitud de la columna y el tamaño de partícula incrementan la magnitud de K' , pero de una manera no tan grande como la polaridad.

$$Y=451.917-6.99084+36.8665B-46.5549C-139.774D-0.571645AB0.723661AC+2.17223AD-6.89014BC-10.5488BD+7.8619CD+0.106503ABC+0163287ABD-0.122294ACD+1.80239BCD-0.0278326ABCD$$

Ecuación 7.3.3

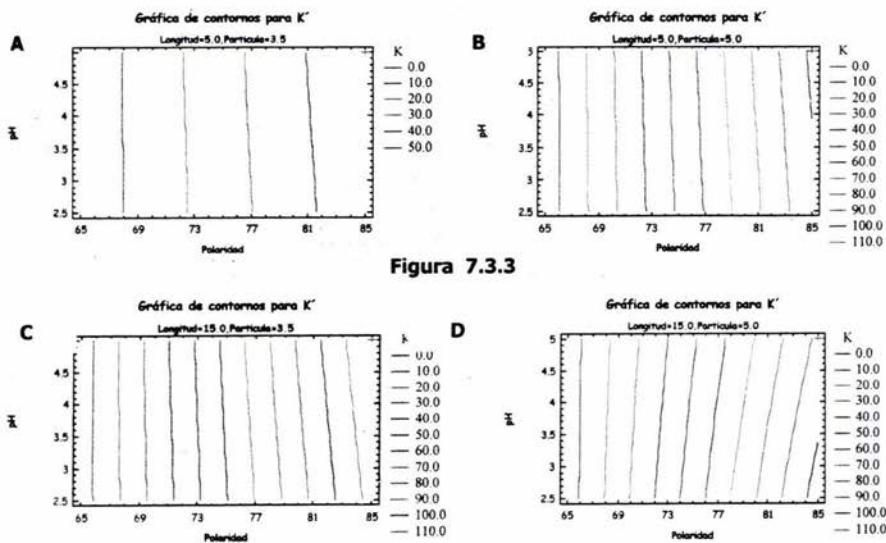
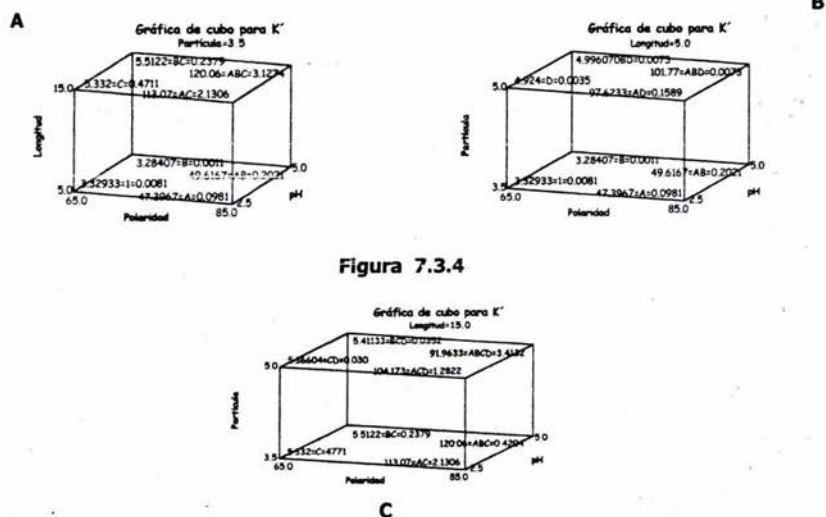


Figura 7.3.3



En la figura 7.3.4 se muestran otro tipo de gráficas muy útiles para analizar la respuesta, en las gráficas de cubo podemos observar el cambio que tiene la respuesta, si tomamos como referencia el vértice del cubo en donde todos los factores se encuentran en su nivel bajo, en este caso se representa como 1, es así que analizamos la tendencia de la respuesta (valor izquierdo), en nuestro estudio para esta respuesta la polaridad tienen un efecto importante, lo cual lo apreciamos en estas gráficas, nótese que al pasar al nivel alto del factor obtenemos un incremento del factor de capacidad, esto lo podemos apreciar al observar las gráficas, notamos también que se presenta un incremento de la respuesta al tener el incremento del factor longitud, tamaño de partícula y aunada la polaridad como ya se había entendido, pero en el caso del pH el efecto que tiene sobre la respuesta es muy poco, este tipo de resultados ya lo esperaba de acuerdo a los resultados obtenidos por la ANOVA. El valor que se encuentra del lado izquierdo de los vértices representa la variabilidad intrínseca de nuestro sistema, lo que nos permite saber que pasara con la variabilidad de nuestro sistema al pasar de un nivel bajo al alto con los factores e interacciones de los factores, en el caso particular del Nípasol con respecto al factor de capacidad encontramos que la menor variabilidad la encontramos en el vértice B+ (gráfica A y B) así como D+, mientras que para el caso contrario tenemos que la mayor variabilidad esta presente en el vértice A+ B+ C+ D+, seguido de A+ B+ C+, es importante señalar que con este tipo de análisis tenemos una doble visión una correspondiente con la magnitud de la respuesta y otra con la variabilidad de nuestro sistema de estudio, sin embargo al situarnos dentro de una región de poca variabilidad del sistema no asegura las mejores condiciones de trabajo.

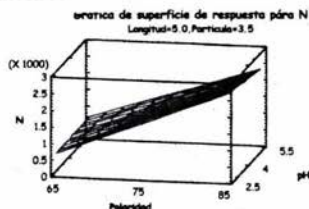




7.4 Análisis del Número de Platos teóricos para la Nipagín. (N)

La función Y (A,B,C,D) en donde A: es Polaridad, B: pH; C: Longitud de columna y D: tamaño de partícula, siendo "Y" es el número de platos teóricos representada en la gráfica de superficie de respuesta en la figura 7.4 Al observar las gráficas A y B tenemos un comportamiento semejante a la furazolidona, nótese que al graficar la polaridad y el pH en la gráfica A, apreciamos el incremento de la respuesta proporcionalmente al incremento de la polaridad, mientras que en la gráfica B tenemos no solo la contribución de la polaridad como efecto importante, en adición la longitud de la columna como el efecto más fuerte sobre la respuesta, este comportamiento es semejante a la furazolidona y se puede atribuir a su polaridad semejante.

Gráfica A



Gráfica B

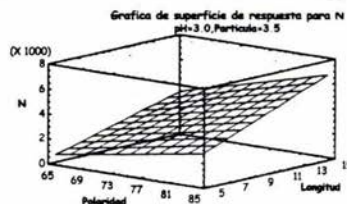


Figura 7.4

7.4.1 Efecto de los factores y las interacciones para N, correspondiente a la Nipagín.

En la tabla 7.4.1 y figura 7.4.1 de efecto estimado para N, encontramos que el pH tiene el efecto más pequeño en comparación con los factores puros, mientras que el tamaño de partícula tiene un efecto negativo sobre la respuesta considerando que el aumento del tamaño de partícula tiene un decremento sobre el área, la polaridad es el segundo más importante con respecto a su magnitud es de esperarse por el efecto importante que tiene para los parámetros cromatográficos, mientras que la longitud de la columna es el efecto más importante, teniendo esta una influencia considerable sobre el área de superficie, recordando que a mayor área se obtiene un número mayor de platos teóricos. Mientras que la interacción AB y ACD tienen el efecto más pequeño y CD el efecto más grande con respecto a la interacción de factores.



Factor o interacción	Efecto
A: Polaridad	1798.68
B: pH	347.292
C: Longitud	2699.89
D: Partícula	-529.642
AB	75.7083
AC	474.608
AD	-444.525
BC	-147.675
BD	175.125
CD	-977.075
ABC	-568.625
ABD	610.042
ACD	87.4083
BCD	-434.642
ABCD	-187.292

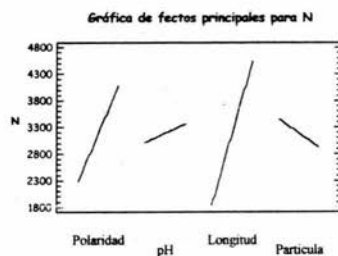


Figura 7.4.1



7.4.2 Análisis de Varianza para N, correspondiente al Nipagin

Mediante la tabla 7.4.2 y la figura 7.4.2 se muestra que factores o interacción de factores son estadísticamente significativos, mediante este análisis deducimos que todos los factores puros son estadísticamente significativos, mientras que la interacción de factores AB resulto ser no significativo, lo podemos observar en la figura 7.4.2 ya que esta interacción se encuentra por debajo de la línea del efecto estandarizado.

Tabla 7.4.2 Análisis de varianza correspondiente a N

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Polaridad	3.88228E7	1	3.88228E7	1907.59	0.0000
B:pH	1.44734E6	1	1.44734E6	71.12	0.0000
C:Longitud	8.7473E7	1	8.7473E7	4298.05	0.0000
D:Particula	3.36624E6	1	3.36624E6	165.40	0.0000
AB	68781.0	1	68781.0	3.38	0.0753
AC	2.70304E6	1	2.70304E6	132.82	0.0000
AD	2.37123E6	1	2.37123E6	116.51	0.0000
BC	261695.0	1	261695.0	12.86	0.0011
BD	368025.0	1	368025.0	18.08	0.0002
CD	1.14561E7	1	1.14561E7	562.90	0.0000
ABC	3.88001E6	1	3.88001E6	190.65	0.0000
ABD	4.46581E6	1	4.46581E6	219.43	0.0000
ACD	91682.6	1	91682.6	4.50	0.0416
BCD	2.26696E6	1	2.26696E6	111.39	0.0000
ABCD	420938.0	1	420938.0	20.68	0.0001
Total error	651257.0	32	20351.8		
Total (corr.)	1.60115E8	47			

Gráfica de pareto para N

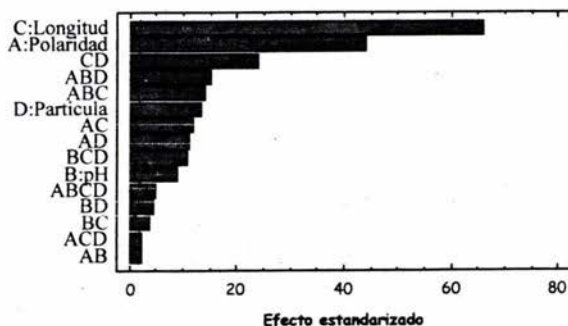


Figura 7.4.2



7.4.3 Representación matemática de la relación factores-respuesta para N

Mediante la ecuación 7.4.3 podemos establecer las relaciones existentes entre los factores y la respuesta, en este caso la letra A: representa la polaridad, B: pH, C: longitud de la columna y D: el tamaño de partícula, mientras que "Y" representa el valor de Número de platos. La aplicación inmediata es predecir el valor de N al existir la variación de uno de los factores, también se pueden realizar gráficas como las mostradas en la figura 7.4.3 en donde tenemos líneas de contornos para N obteniéndose al variar la polaridad y el pH, manteniéndose constante la longitud de la columna y el tamaño de la partícula, noten que solo se está realizando la variación de la respuesta con factores continuos.

$$Y = -61105.9 + 872.941A + 10989.5B + 1253.17C + 16726.9D - 174.663AB - 14.9879AC - 238.214AD - 110.393BC - 3381.48BD - 605.703CD + 3.94156ABC + 52.5133ABD + 8.65711ACD + 103.472BCD - 1.99778ABCD$$

Ecuación 7.4.3

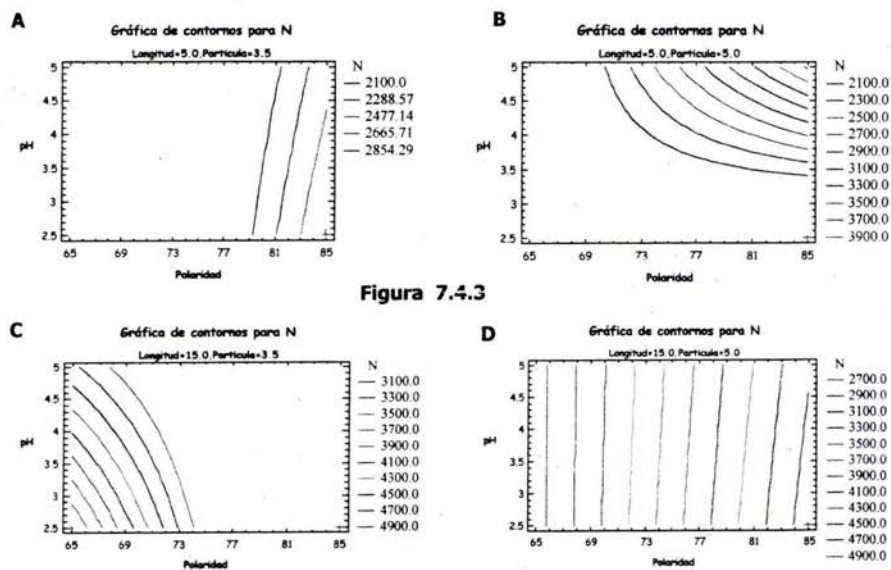


Figura 7.4.3



En las gráficas podemos apreciar el efecto de los factores, nótese que la polaridad tiene un efecto positivo sobre la magnitud de los platos teóricos, ya que se ve reflejado al incrementar la polaridad de la fase móvil. También existe un incremento en el número de platos teórico, al tener un aumento en la longitud de la columna, obsérvese los valores de la gráfica A o B, con respecto a la gráfica C y D, mientras que el tamaño de partícula tiene un efecto negativo sobre la respuesta, entra la gráfica D con respecto a la gráfica C, ya que en esta última se obtienen valores más pequeños de la respuesta, mientras que para el pH no se observa una tendencia importante sobre la respuesta.

En la figura 7.4.4 se muestran otro tipo de gráficas muy útiles para analizar la respuesta, en las gráficas de cubo podemos observar el cambio que tiene la respuesta, al pasar el factor de su nivel bajo hacia el alto, si tomamos como referencia el vértice del cubo en donde todos los factores se encuentran en su nivel bajo, en este caso se representa como 1. El valor del lado izquierdo representa el incremento de la respuesta al posicionarnos en ese vértice, mientras que el lado derecho representa la variación del sistema al ejecutar en esas condiciones experimentales, por lo tanto notamos que como se indicó el incremento de la polaridad y la longitud tienen un incremento en el número de platos teóricos, nótese que también se incrementa la variación del sistema, Apréciense que el vértice en donde se obtiene menor variación es en el B.

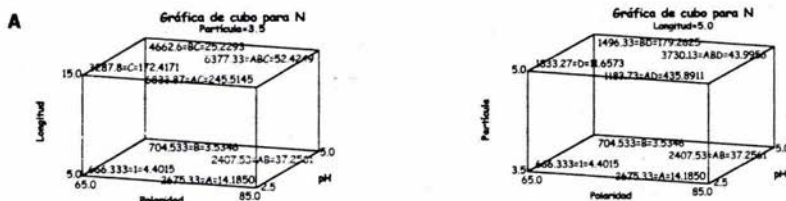


Figura 7.4.4



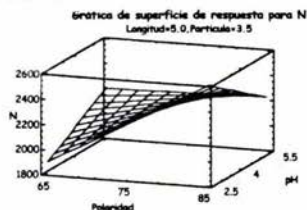
C



7.5 Análisis del Número de Platos teóricos para la Nípasol. (N)

La función Y (A,B,C,D), en donde A: es Polaridad, B: pH; C: Longitud de columna y D: tamaño de partícula, siendo "Y" es el número de platos teóricos representada en la gráfica de superficie de respuesta en la figura 7.5. En la gráfica A se tiene que al ver un incremento de la polaridad se obtiene un incremento de los platos teóricos, mientras que al presentarse un incremento del pH se adquiere como resultado un decremento en el número de platos teóricos, nótese la deflexión de la gráfica A, Mientras que en la gráfica B observamos que la longitud de la columna tiene un efecto muy importante.

Gráfica A



Gráfica B

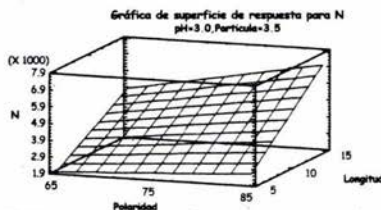


Figura 7.5

7.5.1 Efecto de los factores y las interacciones para N, correspondiente al Nípasol.

En la tabla 7.5.1 y figura 7.5.1 de efecto estimado para N con respecto al Nípasol, tenemos que el tamaño de partícula es el factor que tiene el menor efecto y este con una dirección negativa sobre la respuesta, mientras que la polaridad y el pH tienen un efecto algo semejante en dirección positiva sobre la respuesta, mientras que la longitud de la columna representa el factor más importante ya que este es aproximadamente 3 veces mayor que el resto de los demás, cabe recalcar que este es el compuesto que sale al último de la corrida cromatográfica, siendo este el que se ve más influenciado por cambios de la longitud de la columna y la polaridad. En la figura 7.5.1 se muestra otra forma de percatarse que factor es el que tiene mayor influencia sobre la respuesta.



Factor o interacción	Efecto
A: Polaridad	652.681
B: pH	452.152
C: Longitud	2991.14
D: Partícula	-101.131
AB	-350.235
AC	696.948
AD	-223.285
BC	539.652
BD	-437.715
CD	-1271.06
ABC	-261.735
ABD	466.798
ACD	240.648
BCD	-372.815
ABCD	273.565

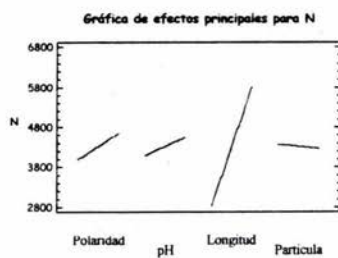


Figura 7.5.1



7.5.2 Análisis de Varianza para N, correspondiente al Nipasol.

Mediante la tabla 7.5.2 y la figura 7.5.2 se muestra que factores o interacción de factores son estadísticamente significativos, mediante este análisis deducimos que los factores longitud de columna, polaridad y pH son estadísticamente significativos, mientras que para el tamaño de partícula no es estadísticamente significativo, el resto de las interacciones de factores son estadísticamente significativos. Mientras que en la figura 7.5.2 se muestra otra forma de visualizar los factores significativos, siendo que están por encima de la línea que representa el valor mínimo para que estos sean significativos.

Table 7.5.2 Analysis of Variance for N - Nipasol

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Polaridad	5.11191E6	1	5.11191E6	163.96	0.0000
B:pH	2.4533E6	1	2.4533E6	78.69	0.0000
C:Longitud	1.07363E8	1	1.07363E8	3443.63	0.0000
D:Particula	122730.0	1	122730.0	3.94	0.0565
AB	1.47198E6	1	1.47198E6	47.21	0.0000
AC	5.82884E6	1	5.82884E6	186.96	0.0000
AD	598277.0	1	598277.0	19.19	0.0001
BC	3.49469E6	1	3.49469E6	112.09	0.0000
BD	2.29913E6	1	2.29913E6	73.74	0.0000
CD	1.93873E7	1	1.93873E7	621.84	0.0000
ABC	822065.0	1	822065.0	26.37	0.0000
ABD	2.6148E6	1	2.6148E6	83.87	0.0000
ACD	694937.0	1	694937.0	22.29	0.0001
BCD	1.66789E6	1	1.66789E6	53.50	0.0000
ABCD	898051.0	1	898051.0	28.80	0.0000
blocks	145988.0	2	72994.0	2.34	0.1135
Total error	935316.0	30	31177.2		
Total (corr.)	1.5591E8	47			

Gráfica de pareto para N

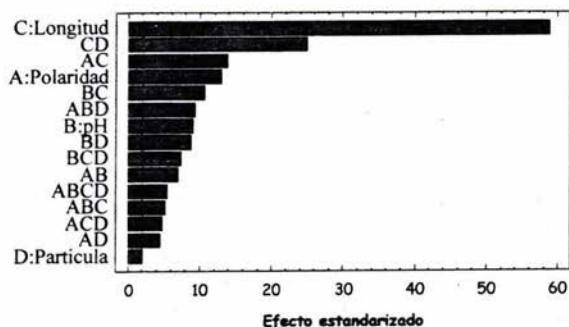


Figura 7.5.2

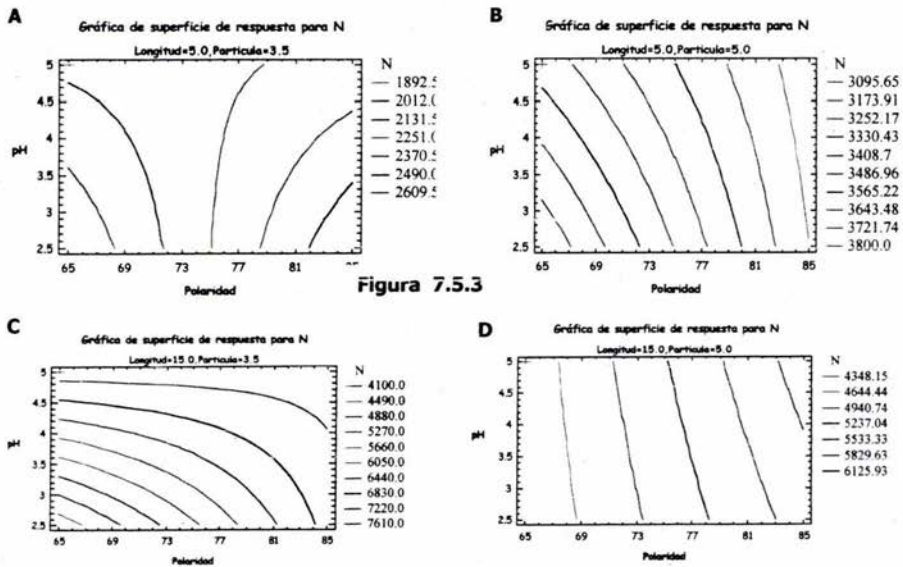


7.5.3 Representación matemática de la relación factores-respuesta para "N"

Mediante la ecuación 7.5.3 podemos establecer las relaciones existentes entre los factores y la respuesta, en este caso la letra A: representa la polaridad, B: pH, C: longitud de la columna y D: el tamaño de partícula, mientras que "Y" representa el valor de Número de platos. La aplicación inmediata es predecir el valor de N al existir la variación de uno de los factores, también se pueden realizar gráficas como las mostradas en la figura 7.5.3, en donde tenemos líneas de contornos para N obteniéndose al variar la polaridad y el pH, manteniéndose constante la longitud de la columna y el tamaño de la partícula, nótese que solo se está realizando la variación de la respuesta con factores continuos.

$$Y = -7155.21 + 68.3038A - 2834.14B - 3353.11C + 3329.44D + 25.1378AB + 47.6908AC - 30.9058AD + 1299.34BC + 485.546BD + 559.696CD - 14.4955ABC - 428433ABD - 7.73394CD - 258.619BCD + 2.91802ABCD$$

Ecuación 7.5.3





En la figura 7.5.3 se aprecian 4 graficas de contornos en donde apreciamos el comportamiento de la respuesta, de esto podemos notar que al haber un incremento en la polaridad se obtiene un incremento en el número de platos teóricos, así mismo obtenemos un comportamiento más marcado al incrementar la longitud de la columna esto se puede apreciar al observar los valores de la grafica A, B con respecto a las graficas C y D, también apreciamos algo interesante con la respuesta, al incrementar el valor de pH tiene una deflexión de la respuesta en dirección negativa de los platos teóricos, esto se ve más refregado al tener un tamaño de partícula pequeño.

En la figura 7.5.4 se muestran otro tipo de gráficas muy útiles para analizar la respuesta, en las gráficas de cubo podemos observar el cambio que tiene la respuesta, al pasar el factor de su nivel bajo hacia el alto, si tomamos como referencia el vértice del cubo en donde todo los factores se encuentran en su nivel bajo, en este caso se representa como 1. El valor del lado izquierdo representa el incremento de la respuesta al posicionarnos en ese vértice, mientras que el lado derecho representa la variación del sistema al ejecutarse en esas condiciones experimentales, por lo tanto notamos que como se indicó que el incremento de la polaridad y la longitud tienen consigo un incremento en el número de platos teóricos, Nótese que en el vértice A+ B+ C- D- se obtiene el valor más pequeño con respecto a la variación del sistema, la ventaja inmediata es que este tipo de análisis nos permite saber ahora que pasa con la variabilidad del sistema en adición al incremento o decremento de la respuesta en ese vértice.

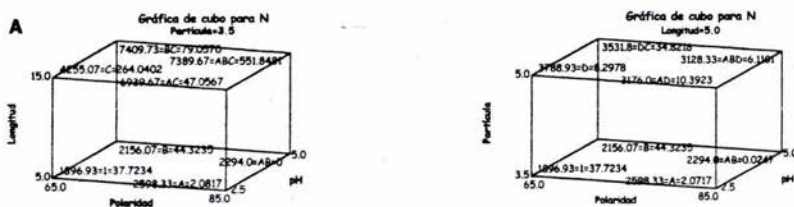
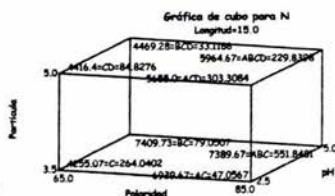


Figura 7.5.4



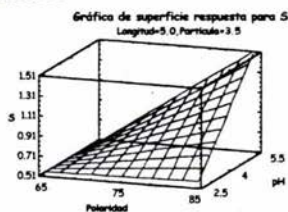
C



7.6 Análisis de la simetría para la Nipagín. (S)

La función Y (A,B,C,D), en donde A: es Polaridad, B: pH; C: Longitud de columna y D: tamaño de partícula, siendo "Y" la simetría representada en la gráfica de superficie de respuesta en la figura 7.6. En la gráfica A observamos que el pH tiene un efecto considerable al compararlo con la polaridad, nótese que al incrementar el valor de pH se obtienen valores de simetría altos, pasando por los valores adecuado de simetría, es decir entre 0.8 y 1.2, mientras que en la gráfica B se tienen ligeros incrementos de la respuesta al incrementar la polaridad, mientras que para longitud notamos una disminución de la respuesta, en adición esta grafica de superficie se encuentra por valores menores de 0.8 de simetría.

Gráfica A



Gráfica B

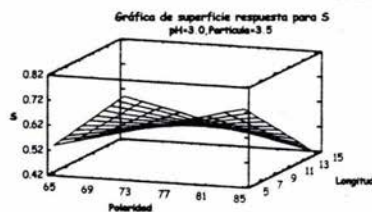


Figura 7.6

7.6.1 Efecto de los factores y las interacciones para S, correspondiente la Nipagín.

En la tabla 7.6.1 y figura 7.6.1 de efecto estimado para S con respecto al Nipagín, tenemos que los factores polaridad, pH y tamaño de partícula tienen un efecto positivo sobre la respuesta, mientras que la longitud de la columna tiene un efecto negativo sobre la respuesta, cabe señalar que el tamaño de partícula es el factor más grande en magnitud, sin embargo esta no difiere de mucho longitud y la polaridad, mientras que para la interacción AC resultan ser la más grande con respecto a la interacción de factores y AD la más pequeña.



Factor o interacción	Efecto
A: Polaridad	0.178896
B: pH	0.0599375
C: Longitud	-0.185396
D: Partícula	0.190437
AB	0.106563
AC	-0.192104
AD	0.0237292
BC	-0.105396
BD	-0.0865625
CD	0.0827708
ABC	-0.0727708
ABD	-0.133271
ACD	0.0947292
BCD	0.136104
ABCD	0.101396

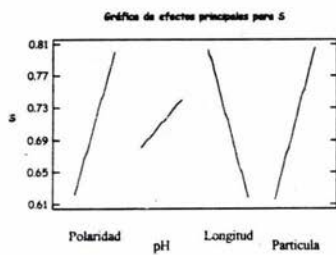


Figura 7.6.1



7.6.2 Análisis de Varianza para S, correspondiente al Nipagín.

Mediante la tabla 7.6.2 y la figura 7.6.2 se muestra que factores o interacción de factores son estadísticamente significativos, mediante este análisis deducimos que todos los factores son estadísticamente significativos, mientras que para la interacción de los factores tenemos que también todos son estadísticamente significativos. Mientras que en la figura 7.6.2 se muestra otra forma de visualizar los factores significativos, siendo que están por encima de la línea que representa el valor mínimo para que estos sean significativos.

Table 7.6.2 Analysis of Variance for S - Nipagin

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Polaridad	0.384045	1	0.384045	599.93	0.0000
B:pH	0.043111	1	0.043111	67.34	0.0000
C:Longitud	0.412459	1	0.412459	644.32	0.0000
D:Particula	0.435197	1	0.435197	679.84	0.0000
AB	0.136267	1	0.136267	212.87	0.0000
AC	0.442848	1	0.442848	691.79	0.0000
AD	0.00675688	1	0.00675688	10.56	0.0027
BC	0.133299	1	0.133299	208.23	0.0000
BD	0.0899168	1	0.0899168	140.46	0.0000
CD	0.0822121	1	0.0822121	128.43	0.0000
ABC	0.0635471	1	0.0635471	99.27	0.0000
ABD	0.213133	1	0.213133	332.94	0.0000
ACD	0.107683	1	0.107683	168.22	0.0000
BCD	0.222292	1	0.222292	347.25	0.0000
ABCD	0.123373	1	0.123373	192.73	0.0000
Total error	0.0204848	32	0.000640151		
Total (corr.)	2.91663	47			

Gráfica de pareto para S

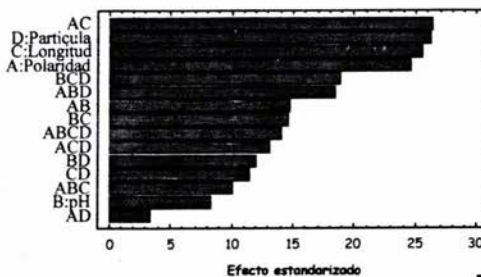


Figura 7.6.2

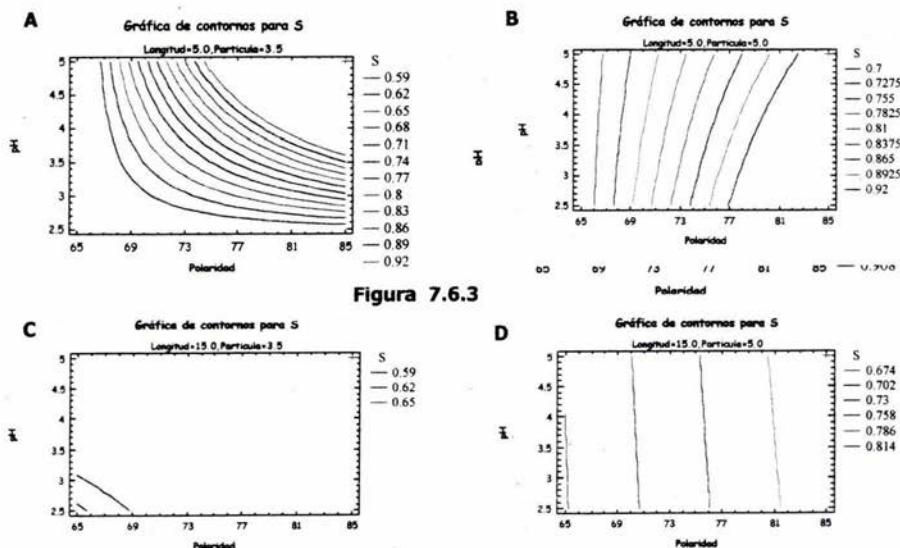


7.6.3 Representación matemática de la relación factores-respuesta para "S"

Mediante la ecuación 7.6.3 podemos establecer las relaciones existentes entre los factores y la respuesta, en este caso la letra A: representa la polaridad, B: pH, C: longitud de la columna y D: el tamaño de partícula, mientras que "Y" representa el valor de la simetría. La aplicación inmediata es predecir el valor de S al existir la variación de uno de los factores, también se pueden realizar gráficas como las mostradas en la figura 7.6.3, en donde tenemos líneas de contornos para S obteniéndose al variar la polaridad y el pH, manteniéndose constante la longitud de la columna y el tamaño de la partícula, nótese que solo se está realizando la variación de la respuesta con factores continuos.

$$Y=0.710469+178896A0.0599375B-0.185396C+0.190437D+0.106563AB-0.192104AC+0.023792AD-0.105396BC-0.0865625BD+0.0827708CD-0.0727708ABC-0.133271ABD0.0947292ACD+0.136104BCD+0.101396ABCD$$

Ecuación 7.6.3





En la gráfica A de la figura 7.6.3 encontramos que al tener ese tipo de curvatura por la influencia de los factores y condiciones experimentales podemos obtener valores de simetría deseado en varias condiciones de trabajo, mientras que en la gráfica B tenemos el incremento del valor de la simetría conforme la fase móvil es más polar, mientras que en la gráfica C y D los cambios de columna traen consigo un decremento de la respuesta en comparación con una columna de longitud menor.

En la figura 7.6.4 se muestran otro tipo de gráficas muy útiles para analizar la respuesta, en las gráficas de cubo podemos observar el cambio que tiene la respuesta, al pasar el factor de su nivel bajo hacia el alto, si tomamos como referencia el vértice del cubo en donde todo los factores se encuentran en su nivel bajo, en este caso se representa como 1. El valor del lado izquierdo representa el valor de la respuesta al posicionarnos en ese vértice, mientras que el lado derecho representa la variación del sistema al ejecutarse en esas condiciones experimentales, por lo tanto notamos que al colocarnos en los vértices AD, ABD, AC y ABCD obtenemos buenas condiciones de trabajo con respecto a la respuesta, mientras que para ABCD y ABD tenemos buenas condiciones de trabajo tanto para respuesta y variabilidad.

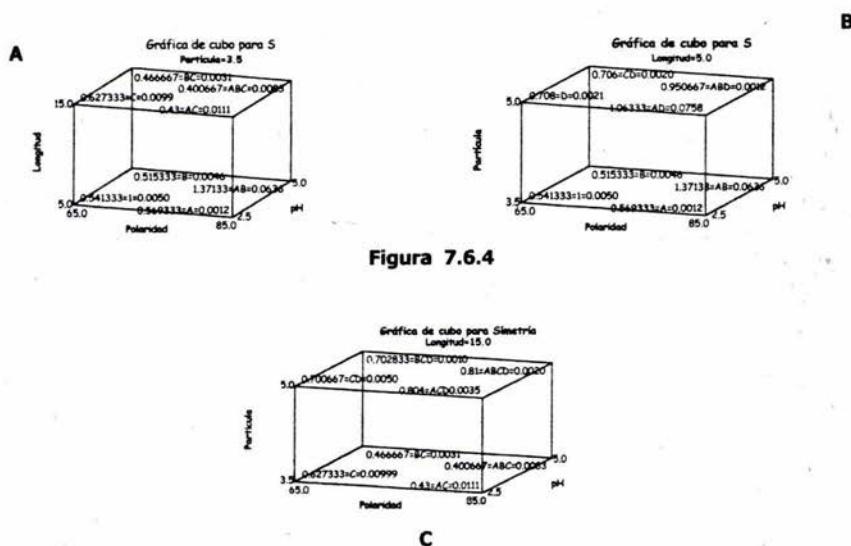


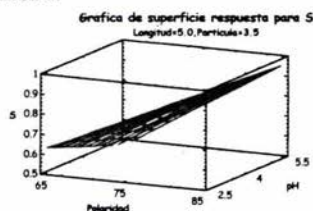
Figura 7.6.4



7.7 Análisis de la simetría para el Nipasol. (S)

La función $Y(A,B,C,D)$, en donde A: Polaridad, B: pH: C: Longitud de columna y D: tamaño de partícula, siendo "Y" la simetría representada en la gráfica de superficie de respuesta en la figura 7.7. En la gráfica A observamos que el incremento en la polaridad tiene como consecuencia un incremento en la simetría, mientras que el pH muestra poco efecto sobre la respuesta, mientras que la gráfica B se muestra que el incremento de la polaridad aumenta el valor de simetría, siendo intensificado el valor de la respuesta por el tamaño de partícula.

Gráfica A



Gráfica B

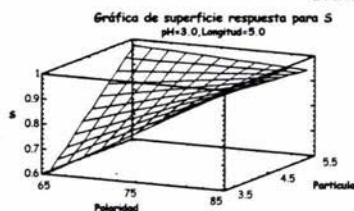


Figura 7.7

7.7.1 Efecto de los factores y las interacciones para S, correspondiente la Nipasol.

En la tabla 7.7.1 y figura 7.7.1 de efecto estimado para S con respecto a la Nipasol, tenemos que los factores polaridad, y tamaño de partícula tienen un efecto positivo sobre la respuesta, mientras que la longitud de la columna y el pH tiene un efecto negativo sobre la respuesta, siendo la polaridad el factor de mayor magnitud de efecto sobre la respuesta, así mismo señalamos que el pH tiene el efecto más pequeño, mientras que para la interacción AD resultan ser la más grande con respecto a la interacción de factores y AB la más pequeña.



Factor o interacción	Efecto
A: Polaridad	0.230875
B: pH	-0.00970833
C: Longitud	-.135542
D: Partícula	0.183958
AB	0.00304167
AC	-0.00445833
AD	-0.142292
BC	0.0289583
BD	0.0114583
CD	0.032625
ABC	-0.0189583
ABD	-0.00979167
ACD	0.0290417
BCD	-0.023875
ABCD	0.018875

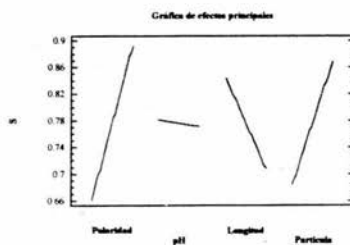


Figura 7.7.1



7.7.2 Análisis de Varianza para S, correspondiente al Nípasol.

Mediante la tabla 7.7.2 y la figura 7.7.2 se muestra que factores o interacción de factores son estadísticamente significativos, mediante este análisis deducimos que los factores polaridad, longitud de la columna y tamaño de partícula son significativos, siendo el pH el único factor estadísticamente no significativo, esto ya se elucidaba por el valor pequeño de su efecto. Mientras que en la figura 7.7.2 se muestra otra forma de visualizar los factores significativos, siendo que están por encima de la línea que representa el valor mínimo para que estos sean significativos.

Table 7.7.2 Analysis of Variance for S - Nipasol

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Polaridad	0.639639	1	0.639639	1525.89	0.0000
B:pH	0.00113102	1	0.00113102	2.70	0.1109
C:Longitud	0.220459	1	0.220459	525.92	0.0000
D:Particula	0.406088	1	0.406088	968.74	0.0000
AB	0.000111021	1	0.000111021	0.26	0.6106
AC	0.000238521	1	0.000238521	0.57	0.4565
AD	0.242963	1	0.242963	579.60	0.0000
BC	0.010063	1	0.010063	24.01	0.0000
BD	0.00157552	1	0.00157552	3.76	0.0620
CD	0.0127727	1	0.0127727	30.47	0.0000
ABC	0.00431302	1	0.00431302	10.29	0.0032
ABD	0.00115052	1	0.00115052	2.74	0.1080
ACD	0.010121	1	0.010121	24.14	0.0000
BCD	0.00684019	1	0.00684019	16.32	0.0003
ABCD	0.00427519	1	0.00427519	10.20	0.0033
blocks	0.000414292	2	0.000207146	0.49	0.6150
Total error	0.0125757	30	0.00041919		
Total (corr.)	1.57473	47			

Grafica de pareto para S

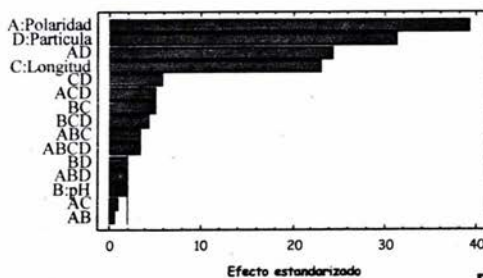


Figura 7.7.2



7.7.3 Representación matemática de la relación factores-respuesta para "S"

Mediante la ecuación 7.7.3 podemos establecer las relaciones existentes entre los factores y la respuesta, en este caso la letra A: representa la polaridad, B: pH, C: longitud de la columna y D: el tamaño de partícula, mientras que "Y" representa el valor de la simetría para el Nípasol. La aplicación inmediata es predecir el valor de S al existir la variación de uno de los factores, también se pueden realizar gráficas como las mostradas en la figura 5.10.3, en donde tenemos líneas de contornos para S obteniéndose al variar la polaridad y el pH, manteniéndose constante la longitud de la columna y el tamaño de la partícula, nótese que solo sé esta realizando la variación de la respuesta con factores continuos.

$$Y = -0.485486 + 0.0222083A - 1.09234B - 0.237858C + 0.249472D + 0.0124144AB + 0.00208722AC - 0.00385AD + 0.08869BC + 0.221744BD + 0.0414833CD - 0.00100733ABC - 0.00253556ABD - 0.000367778ACD - 0.0176467BCD + 0.000201333ABCD$$

Ecuación 7.7.3

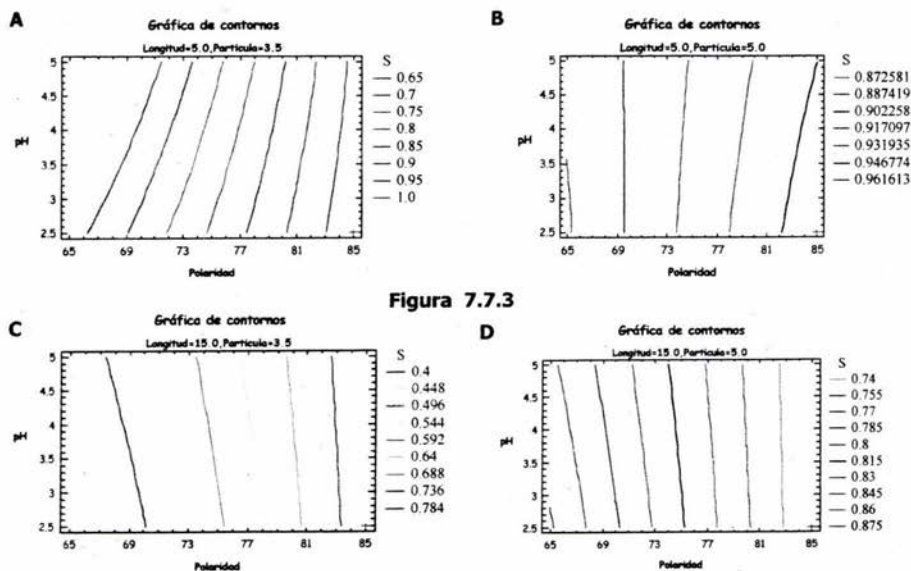
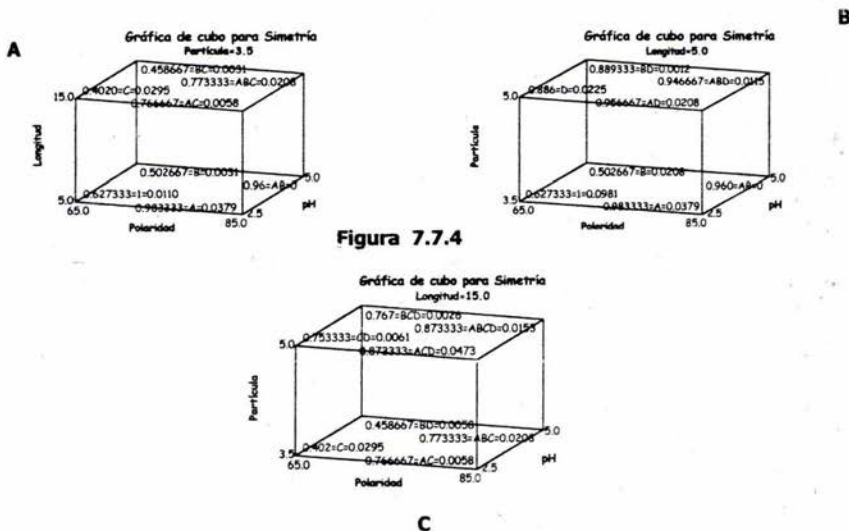


Figura 7.7.3



En la figura 7.7.3 se muestran las graficas de contornos, nótese que todas tienen un compartimiento parecido, ya que la influencia del pH es muy pequeña, el valor de la simetría se ve afectado conforme variamos la polaridad, longitud y el tamaño de partícula, nótese el hecho que el tener longitud de columna pequeñas se mejora la respuesta, es decir tiende a valores cercanos a 1.

En la figura 7.7.4 se muestran otro tipo de gráficas muy útiles para analizar la respuesta, en las gráficas de cubo podemos observar el cambio que tiene la respuesta, al pasar el factor de su nivel bajo hacia el alto, si tomamos como referencia el vértice del cubo en donde todos los factores se encuentran en su nivel bajo, en este caso se representa como 1. El valor del lado izquierdo representa el valor de la respuesta al posicionarnos en ese vértice, mientras que el lado derecho representa la variación del sistema al ejecutarse en esas condiciones experimentales, por lo tanto notamos que al colocarnos en los vértices AD, AB, D, AD, BD, ABD, ACD y ABCD obtenemos buenas condiciones de trabajo con respecto a la respuesta, mientras que para AB y BD tenemos buenas condiciones de trabajo tanto para respuesta y variabilidad.





BIBLIOGRAFÍA

1. Gas Chromatography, A.I.M. Keulemans, 2nd ed., Reinhold Publishing Corp., New York, 1959,p.2
2. Métodos instrumentales de análisis, Hobart H. Willard, Lynne L. Merritt, Jr., John A. Dean, Frank A. Settle, Jr, Grupo Editorial Iberoamericana, S.A. de C.V., México, DF, 1991, p. 505-516,569,603-641.
3. Química analítica cuantitativa, R.A.Day, Jr. A.L Underwood, Prentice-Hall hispanoamericana S.A., México, Quinta edición, p. 586-588,595-602,635-681.
4. Sesiones de cromatografía, Luz María Lara, Waters México S. A. De C. V.
5. The United States Pharmacopeia, USP XXII. USA, 1990.
6. Hokanson, C. "A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, Part I The initial method validation process." Pharmaceutical Technology 18(9), 118-130, 1994.
7. Hokanson, C. "A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, Part II Changes and the need for additional validation" . Pharmaceutical Technology 18(10), 92-100, 1994.
8. Guerra, J. "Validation on analytical methods by FDA laboratories". Pharmaceutical Technology. 10(3), 74-84, 1986.
9. Lual. Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos. La exactitud del método analítico: el error sistemático constante. Segunda parte. Pharma News, 173,24-25, 1993.
10. Internacional vocabulary of basic and general terms in metrology 1993.
11. Cairns, T; Rogers, W. M. Acceptable analytical data for trace analysis. Analytical Chemistry. 55 (1), 54A-57A, 1983.
12. Y Vanden Heyden, F. Questier, D.L. Massart, " A ruggedness test strategy for procedure related factor: experimental set-up and interpretation". , Juornal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 17, 1998, 153-168.
13. H. Fabe " Robustness testing in liquid chromatography and capillary electrophoresis". Juornal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 14, 1996, 1125-1132.



14. Y. Vander Heyden, K. De Braekeleer, Y. Zhu, E. Roets, J. Hoogmartens, J. De Beer, D.L. Massart, "Nested designs in ruggedness testing". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 20, 1999, 875-887.
15. F. Questier, Y Vander Heyden, D.L. Massart "RTS, a computer program for the experimental set-up and interpretation of ruggedness tests". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18, 1998, 287-303.
16. Tahseen Mirza, Henry S. I. Tan "Capillary gas chromatographic assay of camphor and m-cresol in dermatological creams". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 17, 1998, 1427-1438.
17. S. Furlanetto, S. Pinzauti, P. Gratteri, E. La Porta, G. Calzeroni, "Experimental design strategies in the optimization and robustness testing of adsorptive stripping voltammetric conditions for kynurenic acid determination". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15, 1997, 185-1594.
18. M. Jimidar, N. Niemeijer, R. Peeters, J. Hoogmartens, " Robustness testing of a liquid chromatography method for the determination of vorozole and its related compounds in oral tablets". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18, 1998, 479-485.
19. Y. Vender Heyden, D.L. Massart, Y Zhu, J Hoogmartens, J. De Beer, " Ruggedness test on the high performance liquid chromatography assay of the United States Pharmacopoeia 23 for tetracycline-HCL: comparison of different columns in an interlaboratory approach". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 14, 1996, 1313-1326.
20. Statistical Productivity Consultants
21. Diseño y Análisis de Experimentos, Douglas C. Montgomery, Grupo Editorial Iberoamericana, México, DF, 1991 p. 1-11,175-222,241-277.
22. Antibióticos y quimioterapia, L.P Garrod, H.P. Lambert, F.O. Grady. Salvat editores, Barcelona, 198