

Artículo Original

**VERIFICACIÓN DE UNA TÉCNICA POR CROMATOGRAFÍA
LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN PARA CUANTIFICAR
FIPRONILO EN UNA FORMULACIÓN EN CEBOS**

**HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY TECHNIQUE TO
QUANTIFY FIPRONIL IN A BAIT FORMULATION VALIDATION**

Yilian Batista López ¹ <https://orcid.org/0000-0003-0565-8816>
Bárbara González Dávila ¹ <https://orcid.org/0000-0002-2266-9835>
Belkis Rodríguez Arencibia ² <https://orcid.org/0000-0002-2378-1730>

¹ Centro de Ingeniería e Investigaciones Químicas (CI IQ). Dirección postal: Vía Blanca s/n entre Infanta y Palatino. Municipio Cerro, La Habana, Cuba.

² Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a B y 5a F, Playa, La Habana. Cuba.

Recibido: Febrero 11, 2020; Revisado: Marzo 16, 2020; Aceptado: Junio 1º, 2020

RESUMEN

Introducción:

La verificación de un método es un requisito importante en la práctica del análisis químico. La misma consiste en establecer las características de desempeño, las limitaciones del método y la identificación de los aspectos influyentes que puedan cambiar estas características, así como hasta qué punto se puede cambiar

Objetivo:

Desarrollar y verificar una nueva técnica de análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la identificación y cuantificación de Fipronilo en cebo, el cual se utiliza para el control de hormigas forrajeras.

Materiales y Métodos:

Se empleó un cromatógrafo líquido YL9100 con detector de UV/Vis YL9120 bomba cuaternaria YL9110, columna Teknokroma C18; 5 µm de 0,4 × 25 mm. Para el desarrollo de la validación, se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: linealidad, exactitud, precisión y especificidad. Los resultados fueron sometidos a una evaluación estadística descriptiva utilizando el programa Microsoft Excel 2010.



Este es un artículo de acceso abierto bajo una Licencia *Creative Commons* Atribución-No Comercial 4.0 Internacional, lo que permite copiar, distribuir, exhibir y representar la obra y hacer obras derivadas para fines no comerciales.

* Autor para la correspondencia: Yilian Batista, Email: yilian@ciq.cu



Resultados y Discusión:

Se corroboró que la técnica analítica propuesta para la cuantificación del principio activo es lineal, exacta, precisa y específica, así mismo, se constató la confiabilidad de la nueva técnica, garantizando de esta forma la calidad de la formulación.

Conclusiones:

Se logró desarrollar y verificar una nueva técnica de análisis para la identificación y cuantificación de Fipronilo en cebo.

Palabras clave: cebo; Fipronilo; técnica analítica; verificación.

ABSTRACT

Introduction:

Method verification is an important requirement in chemical analysis practice. It establishes performance characteristics, method limitations and influencing aspects that can change these characteristics identification, as well as to what extent it can be changed.

Objective:

To develop and verify a new High Resolution Liquid Chromatography (HPLC) analysis technique for Fipronil, which is used for forage ants control identification and quantification in bait.

Materials and methods:

A liquid chromatograph YL9100 with UV/Vis detector YL9120 quaternary pump YL9110, Teknokroma C18 column; 5 µm of 0.4 × 25 mm was used. For validation development, the following parameters were taken into account: linearity, accuracy, precision and specificity. Results were subjected to a descriptive statistical evaluation using Microsoft Excel 2010 program.

Results and Discussion:

It was corroborated that proposed analytical technique for active principle quantification is linear, exact, precise and specific, likewise, the reliability of this new technique was verified, thus guaranteeing formulation quality.

Conclusions:

It was possible to develop and verify a new analysis technique for Fipronil identification and quantification in bait.

Keywords: bait; Fipronil; analytic technique; check.

1. INTRODUCCIÓN

El Fipronilo es un insecticida de amplio espectro que pertenece a la familia de los fenilpirazoles. Fue descubierto y desarrollado por Rhône-Poulenc Agro entre 1985 y 1987 y puesto en el mercado en 1993 (Colliot y col., 1992). Este compuesto inhibe los canales de cloruro de los receptores de GABA A de los insectos a concentraciones mucho más bajas que las de los receptores de GABA A de los vertebrados. Por tanto, su acción insecticida se debe al potente efecto depresor del sistema nervioso central de los insectos (Islam y Lynch, 2012).

Debido a su efectividad en gran número de plagas, es utilizado a menudo como componente activo de antipulgas para mascotas y antiplagas domésticas, así como para la fumigación de cultivos de maíz, campos de golf, etc. Su uso extensivo debe ser objeto de atención, mediante observaciones en efectos secundarios nocivos en humanos o ecosistemas (Cabrera, 2005).

El Fipronilo se puede encontrar en el mercado en formulaciones tales como polvo, spray, geles, cebos, entre otras, utilizándose diferentes técnicas para su determinación de acuerdo a la formulación.

En Cuba el Ministerio de la Agricultura importa un cebo de Fipronilo de la Compañía Bayer (Plan de Importación de Plaguicidas para el Año (Ajustado), 2017) por lo que el desarrollo de una formulación de este tipo para la producción nacional pudiera contribuir a la sustitución de importaciones. En este sentido es importante contar con una técnica de determinación propia para garantizar el control de la calidad de las formulaciones desarrolladas.

Teniendo en cuenta lo anterior, este trabajo tiene como objetivo desarrollar y verificar una nueva técnica de análisis por HPLC para la identificación y cuantificación de Fipronilo en cebo, el cual se utiliza para el control de hormigas forrajeras.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Equipos

Cromatógrafo líquido YL9100 con detector de UV/Vis YL9120, bomba cuaternaria YL9110, columna Teknokroma C18; 5 µm de 0,4 × 25 mm. Balanza técnica RADWAG AS310/X (precisión 0,001). Agitador magnético LTE Scientific.

2.2. Sustancias y reactivos

Patrón de Fipronilo al 99%, metanol marca Panreac, acetonitrilo marca Quimefa, agua bidestilada, todos para uso en HPLC. Para la preparación de la matriz de la muestra se utilizó harina de maíz, miel de purga y agua.

Las principales propiedades y características del Fipronilo se presentan en la Tabla 1 (British Crop Protection Council, 2003).

Tabla 1. Principales propiedades y características del Fipronilo

<i>Propiedad/Característica</i>	<i>Valor</i>
Nombre común	Fipronilo (BSI, pa E-ISO)
Nombre IUPAC	(±)-5-amino-1-(2,6-dicloro- a, a, a-trifluoro- <i>p</i> -tolil)-4-trifluorometilsulfinilpirazol-3-carbonitrilo
Peso Molecular	437,2 g/mol
Fórmula molecular	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS
Estado de agregación y color a temperatura ambiente	Sólido blanco
Temperatura de fusión	200-201 °C
Presión de vapor	3,7x10 ⁻⁴ mPa (25 °C)
Densidad	1,477-1,626 (20 °C)
Solubilidad en agua	1,9 (pH 5), 2,4 (pH 9), 1,9 (agua destilada) (todos

	expresados en mg/L, a 20 °C).
Solubilidad en otros solventes	acetona 545,9, diclorometano 22,3, n-hexano 0,028, tolueno 3,0 (expresados en g/L, a 20 °C).
Estabilidad	Estable en agua a pH 5 y 7; ligeramente hidrolizado a pH 9. Estable al calor. Se degrada ligeramente por exposición a la luz solar. En solución acuosa sufre fotólisis rápidamente.

2.2.1. Soluciones

Patrón de Fipronilo

Se pesaron exactamente 0,0253 g de estándar de Fipronilo en un volumétrico de 25 mL y se enrasó con metanol.

Muestra

Se pesó aproximadamente 1g del cebo de Fipronilo, se extrajo con 5 mL de metanol durante 15 minutos. Posteriormente se filtró con filtros de 0,45 µm y de la solución resultante se tomó 0,1 mL que se adicionaron a un volumétrico de 10 mL y se enrasó con metanol.

Se inyectaron 20 µL de la solución patrón y seguidamente la misma cantidad de la muestra por triplicado.

Matriz (contiene todos los componentes del cebo de Fipronilo, excepto el ingrediente activo)

Se tamizó la harina de maíz (soporte) hasta un tamaño de partícula menor de 0,5 mm. Se adicionó la miel de purga y agua. Se mezcló manualmente hasta lograr homogeneidad y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, la matriz se envasó en un recipiente de cristal ámbar cerrado.

2.3. Técnica cromatográfica

En la Tabla 2 se resumen las condiciones cromatográficas de la nueva técnica bajo las cuales se realizó la verificación.

Tabla 2. Condiciones cromatográficas para el análisis del Fipronilo

<i>Parámetro</i>	<i>Valor</i>
Fase móvil	Acetonitrilo – Agua (65:35)
Solvente	Metanol
Flujo de fase móvil	1 mL/min
Columna C18	Teknokroma
Temperatura	25 °C
Longitud de onda	280 nm
Volumen de inyección	20 µL

2.4. Cálculos

El porcentaje de ingrediente activo en la formulación se determinó empleando la ecuación (1):

$$\% \text{ de ingrediente activo} = \frac{R_m}{R_p} * \frac{P_p}{P_m} * P * \rho \quad (1)$$

Donde: R_m – Valor de la altura del pico de la muestra (mV).

R_p – Valor de la altura del pico del patrón (mV).

P_p - ingrediente activo en la disolución patrón (mg).

P_m - peso de la muestra (mg)

P - pureza del patrón

ρ - densidad de la muestra (g/L)

2.5. Análisis estadístico

Se determinó la linealidad, precisión, exactitud y especificidad de la técnica basándose en la guía de validación de técnicas analíticas para formulados agroquímicos del Consejo Colaborativo Internacional de Análisis de Plaguicidas (CIPAC por sus siglas en inglés) (Guidelines for CIA, 1986). La curva de calibración y los resultados de regresión lineal, así como los parámetros estadísticos: media, desviación estándar (SD) y desviación estándar relativa (RSD), fueron determinados por el programa de computación *Microsoft Excel 2010*.

Prueba F:

F se calcula mediante la siguiente fórmula

$$F = \frac{RSD^2}{RSD's^2} \quad (2)$$

Donde: RSD: Desviación estándar relativa de la repetibilidad.

RSD's: Desviación estándar relativa de la exactitud.

Prueba t

Primeramente, se calcula t mediante la siguiente fórmula:

$$t = \frac{|\bar{x} - \mu| \sqrt{n}}{s} \quad (3)$$

Donde: μ : valor real, \bar{x} : Media, n : número de muestra, s : desviación estándar (SD)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de análisis que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de un analito en un rango definido (Guidelines for CIA, 1986).

Para estudiar la linealidad se prepararon cinco pesadas del patrón de Fipronilo abarcando el 20 % tanto por encima como por debajo de la cantidad recomendada por la técnica que se valida (0,025 g) y se determinó el intercepto, la pendiente, la desviación estándar (SD) y el coeficiente de correlación (r), (British Crop Protection Council, 2003). Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 3 y 4.

Se puede apreciar en la Tabla 3 que el resultado obtenido para el coeficiente de correlación (0,9997) es mayor que 0,990, valor mínimo requerido para que la linealidad sea aceptable, por lo que se puede decir que la técnica analítica es lineal en el rango de concentración estudiado.

Tabla 3. Resultados de la linealidad del método

<i>Parámetro estadístico</i>	<i>Resultados</i>
Coeficiente de correlación	0,9997
Valor del Intercepto	-4,5
Valor de la pendiente	602,9
Desviación estándar(SD)	96,9

Tabla 4. Datos de la curva calibración (Linealidad del método Fipronilo)

<i>Concentración (mg/mL)</i>	<i>Altura (mV)</i>
1,204	720,2
1,116	669,0
1,012	606,3
0,908	544,7
0,8	476,2

3.2. Precisión

La precisión es una medida de que tan cerca están los resultados entre sí y usualmente se expresa por medio del valor de la desviación estándar, que describe la dispersión, o sea, que describe la magnitud de los errores aleatorios (Gustavo, 1999). Puede ser expresada como repetibilidad y reproducibilidad (Guidelines for CIA, 1986).

Para la precisión se prepararon cinco réplicas de la muestra y se determinó el por ciento de ingrediente activo. Posteriormente se determinó la media, la desviación estándar y se comparó con la obtenida en la ecuación de Horwitz la cual es:

$$RSDr < 2(1 - 0,5\log C) * 0,67 \quad (4)$$

donde C = concentración del analito (% p/p) en la muestra como una fracción decimal (Miller, y Miller, 1988); (Miller, 2000).

En la Tabla 5 se pueden observar los resultados obtenidos.

Tabla 5. Resultados de la precisión del método

<i>Muestra</i>	<i>Concentración (% p/p)</i>
1	0,0753
2	0,0592
3	0,0612
4	0,0627
5	0,0686
\bar{x}	0,065
SD	0,006
RSD	0,1007
RSDr	4,040

La ecuación de Horwitz es el resultado de estudios de intercomparación realizados por el CIPAC en laboratorios internacionales acreditados donde se controla la calidad de

plaguicidas. A partir de estos estudios se llegó a la conclusión de que la precisión para técnicas analíticas donde se determinen ingredientes activos de formulados de plaguicidas con concentraciones entre 100 y 0,25 %, será aceptable si la desviación estándar relativa (RSD) obtenida es inferior al valor determinado por la mencionada ecuación (Guidelines for CIA, 1986). En este caso, se puede afirmar que el método es preciso pues como se observa en la Tabla 5, $RSD(0,1007) < RSDr(4,040)$.

3.3. Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximos posibles al valor verdadero. A diferencia de la precisión, que refleja el error aleatorio, la exactitud refleja el error sistemático o la tendencia a él (Gustavo, 1999).

La exactitud de un procedimiento debe ser determinado por el examen de un número de muestras a la cual se le añade una cantidad de analito conocida.

Para esta prueba se preparó una disolución patrón de Fipronilo de concentración 1 mg/mL y se le añadió 1 mL a cada muestra, lo cual equivale a un 0,1 % p/v. En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 6. Resultados obtenidos en la determinación de Fipronilo para la exactitud

<i>Muestra</i>	<i>Concentración (% p/p)</i>
Blanco	0,0547
1	0,1506
2	0,1595
3	0,1595
4	0,1596
5	0,1598
Promedio	0,1578
\bar{X}	0,1578
SD	0,0065
CV	4,0948
RSD's	0,0409

Prueba F:

El valor obtenido mediante la ecuación 2 se compara con el tabulado a $P = 0,05$

$$F = 6,05457853 \quad F_{0,05} = 6,39$$

Como el valor de F calculado es menor que el tabulado se puede afirmar que no hay diferencias significativas entre las desviaciones estándar relativas.

Prueba t

El valor obtenido mediante la ecuación 3 se compara con el tabulado a $P = 0,05$.

$$t = 0,657573843 \quad t_{0,05} = 2,132$$

Se puede observar que el valor calculado es menor que el tabulado por lo que no hay errores sistemáticos en la técnica.

% de recuperación

El % de recuperación se calcula mediante la ecuación 5.

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\% \text{ determinando}}{\% \text{ añadido}} * 100 \quad (5)$$

% recuperación = 101,8 %

El resultado obtenido es satisfactorio ya que se encuentra en el rango de por ciento exigido. Concluido el procedimiento propuesto para el análisis de los resultados se puede afirmar que la técnica es exacta.

3.4 Especificidad

La especificidad es la habilidad para calcular inequívocamente un analito en presencia de otros componentes que se espera que esté presente.

Para realizar el estudio de la especificidad del método se analizaron los cromatogramas del solvente, los ingredientes de los excipientes (placebo) utilizados en la formulación del Fipronilo, así como el cromatograma del estándar del principio activo. Se realizaron tres inyecciones del solvente y del placebo, tres inyecciones del patrón de Fipronilo así como tres inyecciones de la muestra a analizar. Primero se analizó el solvente con el objetivo de observar que no hubiera interferencia con el pico cromatográfico de interés, seguidamente se analizó el cromatograma correspondiente al placebo con el propósito de demostrar que no existen interferencias debida a los excipientes, posteriormente se analizó el cromatograma del estándar de Fipronilo, así como el de la muestra. Tal como se observa en la Figura 1, no existe ninguna interferencia.

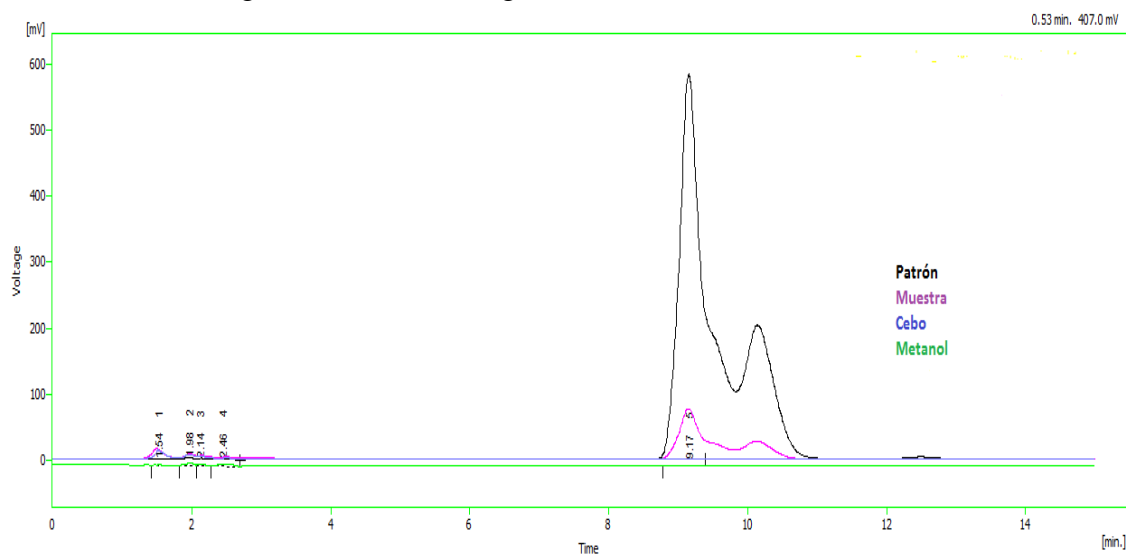


Figura 1. Resumen de los cromatogramas del patrón, la muestra, el placebo y el solvente (metanol)

4. CONCLUSIONES

1. La nueva técnica implementada para la determinación de Fipronilo, formulado como cebo, por HPLC, arrojó buenos resultados.
2. La nueva técnica analítica cumple con los requisitos exigidos, linealidad, precisión, exactitud y especificidad; permitiendo garantizar el control de la calidad de las formulaciones desarrolladas.

REFERENCIAS

- Colliot, F., Kukorowski, K.A., Hawkins, D.W. & Roberts, D.A., Fipronil: A New Soil and Foliar Broad Spectrum Insecticide., Brighton Crop Protection Conference Pest and Diseases, Brighton, 23-26 November 1992, pp. 29-34.
- British Crop Protection Council., The e-Pesticide Manual., Twelfth Edition, Version 2.2, England, 2003, pp. 800-810.
- Cabrera, F., Categorización y triangulación como procesos de validación del conocimiento en investigación cualitativa., *Theoria*, Vol. 14, No. 1, 2005, pp. 62-64.
- Guidelines for CIA Collaborative Study Procedures for Assessment of Performance Analytical Methods (published through GI)., 1986, pp. 8-12.
- Gustavo, D., Principios de estadística y técnicas de validación., UNAN-León, Editorial Universitaria, 1999, pp. 20-30.
- Islam, R., & Lynch, JW., Mechanism of action of the insecticides, lindane and fipronil, on glycine receptor chloride channels., *British Journal of Pharmacology*, Vol. 165, No. 8, 2012, pp. 2707-2720.
- Miller, J.C., & Miller, J.N., *Statistics for Analytical Chemistry.*, 2nd edition Ellis Horwood, 1988, pp. 200-220.
- Miller, J.N., *Manual on Basic Statistics.*, Head Agrochemical Unit FAO-IAEA, 2000, pp. 95-100.
- Plan de Importación de Plaguicidas para el Año 2018 (Ajustado)., Ministerio de la Agricultura, Dirección de Sanidad Vegetal, 2017, pp. 9-10.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

- Lic. Yilian Batista López. Realizó el estudio, análisis y escritura del artículo.
- Ing. Bárbara González Dávila. Realizó la corrida de las muestras en el cromatógrafo líquido y colaboró con el análisis de los resultados.
- Ing. Belkis Rodríguez Arencibia. Colaboró con el análisis de los resultados y la escritura del artículo.