

12
20j

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS CUANTITATIVO DE MEZCLAS DE
SULFAMETOXAZOL Y TRIMETOPRIM POR
ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON
TRANSFORMADA DE FOURIER**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

Q U Í M I C A

P R E S E N T A:

OLGA LORA DE LA FUENTE

MÉXICO, D. F.,



1998

**COLEGIO PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

263818



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.

JURADO

Presidente	Prof. POZAS HORCASITAS ROCIO
Vocal	Prof. CERVERA FLORES ERNESTINA
Secretario	Prof. GARCIA OSUNA ADOLFO
1er. suplente	Prof. HERNANDEZ GARCIADIEGO LUCIA
2do. Suplente	Prof. DUARTE LISCI GEORGINA ARTEMISA

El trabajo se desarrollo en la Facultad de Química en el Departamento de Química Analítica
División Estudios de Posgrado.

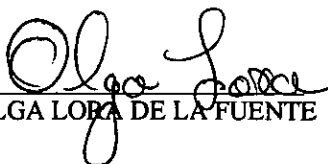
ASESOR DEL TEMA


Prof. CERVERA FLORES ERNESTINA

SUPERVISOR TECNICO


Prof. SILVIA MENDOZA ARELLANO

SUSTENTANTE


OLGA LORA DE LA FUENTE

A mi familia:
Tere y Silverio, mis padres,
Telesforo, mi abuelo,
Carlos y Sonia, mis hermanos
Berna,
Rosalbi y Andrea, mis tias
Laura, Mary y Hector, mis primos
Panfilo, mi tio

GRACIAS

INDICE

Capítulo 1	Introducción	1
Capítulo 2	Fundamentos Teóricos	
2.1	Espectroscopia infrarroja	5
2.2	Preparación de muestras sólidas para análisis por espectroscopia infrarroja	11
2.3	Análisis cuantitativo espectrofotométrico	18
2.4	Diseño experimental simplex	26
2.5	Descripción del software Quant+	28
Capítulo 3	Desarrollo Experimental	
3.1	Caracterización de los fármacos	33
3.2	Selección de los parámetros de procesamiento de datos del espectrofotómetro FTIR	37
3.3	Construcción de la curva de calibración	42
3.4	Preparación de muestras	44
3.5	Análisis espectroscópico	45
3.6	Construcción del modelo de calibración	46
Capítulo 4	Resultados	
4.1	Resultados de las variables experimentales	69
4.2	Resultados de calibración	71
4.3	Resultados de predicción para las muestras problema	75
Capítulo 5	Conclusiones	80
	Bibliografía	85

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Una de las etapas más importantes en la comprobación de la calidad de los medicamentos, en la industria farmacéutica, es la determinación analítica cuantitativa de los fármacos.¹ La mayoría de los medicamentos son una combinación de fármacos y excipientes mezclados en ciertas proporciones; generalmente los fármacos se deben separar del excipiente para después analizarlos por métodos espectroscópicos o cromatográficos. De aquí surge el interés por desarrollar una metodología para realizar el análisis cuantitativo simultáneo de mezclas de fármacos, sin separación previa.

En este trabajo se estudia específicamente la mezcla Trimetoprim-Sulfametoxazol, son sustancias que frecuentemente se encuentran asociadas en formulaciones farmacéuticas.² El Trimetoprim y el Sulfametoxazol son compuestos sintéticos, utilizados en el ámbito de la medicina como antibacterianos. La mezcla de ambos fármacos se utiliza especialmente en el tratamiento de infecciones del tracto urinario, vías respiratorias, gastrointestinales y genitales no controlables por otros antibacterianos similares. La combinación de los dos fármacos es sinérgica, es decir, suman su acción antibacteriana, si un microorganismo adquiere resistencia a uno de los fármacos, éste puede ser destruido por el otro. El grado máximo de sinergismo se produce cuando los microorganismos son sensibles a ambos fármacos.³

Actualmente, la cuantificación de la mezcla Trimetoprim-Sulfametoxazol se realiza por la técnica publicada en la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos⁴, vía cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). En la literatura existente sobre el tema, se encuentran registrados tres métodos de cuantificación adicionales:

- 1) Determinación colorimétrica.⁵
- 2) Determinación por espectroscopia de resonancia magnética nuclear.^{6,7}
- 3) Determinación por espectroscopia ultravioleta aplicando segunda derivada.⁸

En estos casos, se requiere desarrollar color o separar los fármacos de los excipientes por extracción con disolventes, y posteriormente realizar la cuantificación, lo que hace a los métodos costosos y largos.

El objetivo del presente trabajo es desarrollar un método analítico, que en forma directa (sin separar previamente los excipientes, desarrollar color o diluir) cuantifique los dos fármacos simultáneamente y pueda aplicarse en el control de calidad de los medicamentos.

Para dar solución a este problema analítico se utilizó la técnica de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier, el accesorio esfera de integración y métodos quimiométricos de análisis.

Hasta antes de 1990, la espectroscopia de infrarrojo tenía su principal aplicación en la identificación de compuestos mediante la interpretación de las bandas de absorción del espectro y en menor proporción en mediciones cuantitativas de un sólo componente, debido a que las características de los espectros de muestras multicomponentes hacían difícil o imposible desarrollar métodos cuantitativos repetibles.

Actualmente, los espectrofotómetros de infrarrojo con transformada de Fourier presentan importantes avances tecnológicos, que permiten procesar los datos en una unidad de computo para obtener información que anteriormente era difícil identificar. Ésto, ha contribuido a un creciente interés en la espectroscopia de infrarrojo, puesto que, no sólo se utiliza en forma rutinaria para identificar compuestos o realizar mediciones cuantitativas sencillas, también se utiliza para estimar concentraciones de especies en sistemas multicomponentes.^{9-14, 16}

Otro punto importante en el desarrollo de la espectroscopia infrarroja es la utilización de nuevos accesorios de muestreo, los cuales minimizan la preparación de muestra, no utilizan disolventes y permiten realizar mediciones rápidas, uno de ellos es el accesorio esfera de integración.¹⁵

En la mayoría de los análisis, el excipiente (lubricantes, desintegrantes, colorantes, antioxidantes, saborizantes, recubrimientos, etc.) se considera una interferencia porque estas especies generalmente absorben en la misma región espectral en la que absorben los activos. Sin embargo, en el análisis de sistemas multicomponentes, como son las mezclas farmacéuticas, por espectroscopia de infrarrojo, el hecho de que todas las especies absorban radiación infrarroja en la misma región espectral no importa, porque el análisis se realiza mediante métodos quimiométricos con los cuales se observa cualquier variación en el espectro completo y no en una sólo banda como en el análisis clásico.¹⁶

La quimiometría es la disciplina que se encarga de aplicar métodos estadísticos, matemáticos y lógicos al diseño de experimentos y análisis de datos. Los métodos quimiométricos ofrecen herramientas para obtener información confiable, modelar y predecir empíricamente el comportamiento

de sistemas altamente complejos que implican la interacción de muchas variables, basándose en datos experimentales.^{17, 18}

La finalidad del análisis cuantitativo con métodos quimiométricos es crear una ecuación o serie de ecuaciones de calibración que posteriormente se utilizan para calcular las concentraciones de los componentes de interés en las muestras problema utilizando únicamente el espectro de éstas.

Para calcular estas ecuaciones, se necesita un grupo de muestras estándar que deben presentar la composición de las muestras problema tan cercanamente como sea posible, en las cuales se debe conocer todas las concentraciones de los componentes de interés. Estos estándares se diseñan para cubrir un intervalo de concentración más amplio que el esperado en las muestras problema. Los espectros de las muestras estándar y de las muestras problema se miden y registran bajo las mismas condiciones.

El grupo de espectros de las muestras estándar y sus concentraciones forman la curva de calibración, con la cual, se construyen las ecuaciones que se utilizan para calcular las concentraciones de los componentes en las muestras problema. El paquete de "software" que se utilizó en este trabajo para generar las ecuaciones de calibración es QUANT + de la compañía de instrumentación Perkin-Elmer Corporation.¹⁹

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA ²⁰⁻²³

La espectroscopia infrarroja tiene amplia aplicación en el análisis cualitativo para la determinación de la estructura molecular e identificación de compuestos orgánicos. La espectroscopia infrarroja también está encontrando un uso cada vez mayor en el análisis cuantitativo, lo que permite la cuantificación de una o varias sustancia en una muestra compleja, sin necesidad de separar previamente. También puede ser utilizada como sistema de detección en cromatografía de gases, donde su capacidad para identificar compuestos se combina con la capacidad de separación; o para determinar el orden de reacción y el proceso químico que ocurre en un sistema reaccionante, mediante el uso de celdas térmicas controladas se pueden estudiar las reacciones a las temperaturas empleadas en los procesos industriales. Las aplicaciones analíticas de la espectroscopia infrarroja la han convertido en una herramienta indispensable en el laboratorio químico.

La región infrarroja es la zona del espectro electromagnético que se encuentra entre la región visible y la región de las microondas.

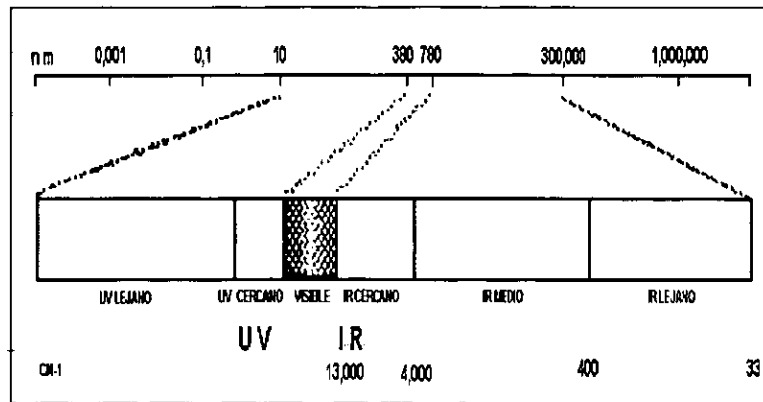


Figura 2.1: Espectro electromagnético

Como toda radiación electromagnética la radiación infrarroja se representa como un campo eléctrico que oscila periódicamente, estas oscilaciones son perpendiculares a la dirección de propagación de la onda; y un campo magnético que oscila con la misma frecuencia y perpendicular al campo eléctrico. La radiación infrarroja, como cualquier radiación electromagnética, se caracteriza por la frecuencia de oscilación (ν) o por la longitud de onda (λ). La relación entre estos dos parámetros es la siguiente:

$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$

En donde:

λ es la longitud de onda en centímetros (cm)

$c \approx 3 \times 10^{10}$ cm/s, es la velocidad de propagación de la luz en el vacío

ν es la frecuencia en ciclos por segundo (s^{-1})

La radiación electromagnética posee determinada cantidad de energía, la energía se relaciona con la frecuencia como sigue:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

En donde:

E es la energía en J por molécula

$h = 6.6256 \times 10^{-34}$ J s, es la constante de Planck

Para identificar las posiciones de las bandas en espectroscopia infrarroja se utiliza el número de onda (ν), es decir, el número de ondas por centímetro y se expresa en cm^{-1} . La región infrarroja del espectro se encuentra entre los 13 000 y los 33 cm^{-1} . Esta región se subdivide en tres regiones, de acuerdo al diferente tipo de información que se obtiene de cada una de ellas:

La región del infrarrojo cercano comprende de 13 000 a 4 000 cm^{-1} , en esta región se encuentran las bandas de absorción debidas únicamente a los sobretonos de las vibraciones fundamentales.

La región del infrarrojo medio comprende de 4 000 a 400 cm^{-1} , en esta región se encuentran las bandas de absorción debidas a las vibraciones fundamentales de las moléculas.

La región del infrarrojo lejano comprende de 400 a 33 cm^{-1} , en esta región, además de las bandas de vibración se encuentran las bandas de absorción debidas a la rotación de las moléculas.

Todas las moléculas están formadas de átomos unidos por enlaces químicos. Estos átomos vibran uno con respecto al otro alrededor de sus posiciones de equilibrio y el enlace actúa como un resorte que los conecta entre sí. Cada molécula tiene un conjunto de frecuencias de vibración en la región infrarroja que son características de los enlaces químicos que la forman.

Al incidir radiación infrarroja de una determinada frecuencia en una muestra compuesta de moléculas cuyas uniones químicas vibran a la misma frecuencia de la radiación incidente, las moléculas absorben la radiación e incrementan su energía vibracional. Si la frecuencia de la radiación incidente es diferente de las frecuencias de vibración características de las moléculas, la radiación pasa a través de ella sin interactuar.

Las frecuencias de vibración de una molécula dependen de las masas de los átomos que la forman, la fuerza de los enlaces que los conectan y la distribución espacial de los átomos. Las frecuencias vibracionales fundamentales, se presentan cuando las moléculas absorben radiación infrarroja que las promueve del estado basal ($v = 0$) al primer estado vibracional excitado ($v = 1$). Las transiciones desde el estado basal al segundo o tercer estados excitados (o posteriores), dan lugar a las bandas correspondientes a los sobretonos. En la región infrarroja se observan únicamente, aquellas vibraciones que producen un cambio periódico en el momento dipolar de un par o grupo de átomos.

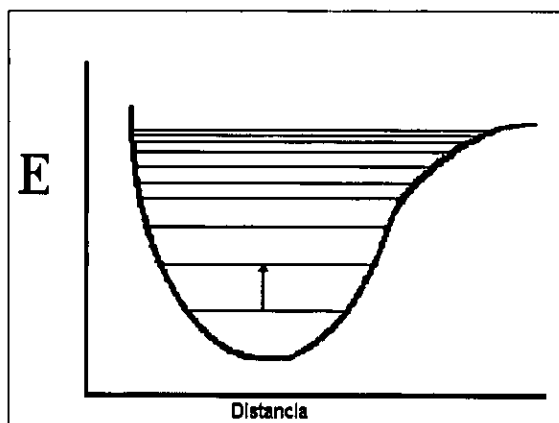


Figura. 2.2: Absorciones fundamentales

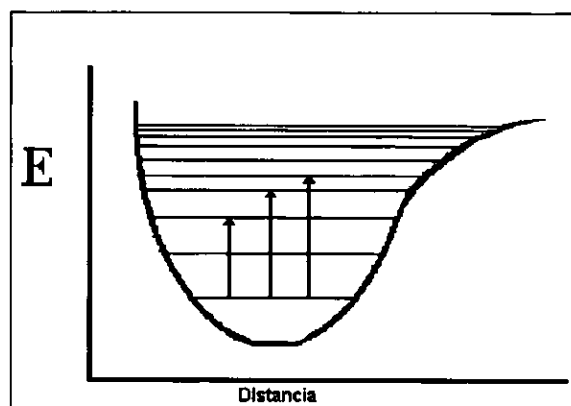


Figura 2.3: Absorciones de sobretonos

Hay dos tipos de vibraciones moleculares: vibraciones de tensión y vibraciones de deformación. Una vibración de tensión es un movimiento rítmico a lo largo del eje del enlace, de tal forma que la distancia interatómica aumenta y decrece, estas vibraciones pueden ser simétricas o asimétricas. Una vibración de deformación consiste en un cambio en el ángulo del enlace, entre enlaces con un átomo común. Las vibraciones de deformación se subdividen en tijera, torsión, aleteo y balanceo.

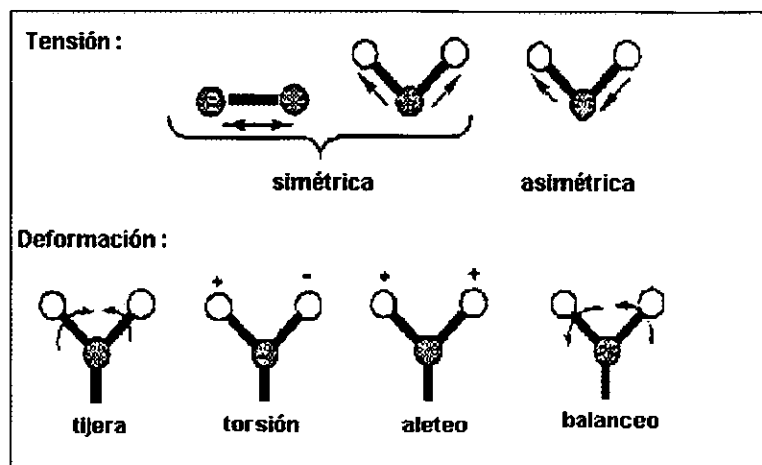


Figura 2.4: Tipos de vibraciones

El registro gráfico del porcentaje de radiación transmitida (o absorbida) por una muestra de sustancia, en función del número de onda de la radiación infrarroja incidente, se conoce como espectro de infrarrojo, y está íntimamente relacionado con las vibraciones moleculares. El espectro de un compuesto químico en la región infrarrojo medio se considera como una propiedad física inherente que se utiliza para caracterizar la muestra.

Los espectros en el infrarrojo cercano presentan bandas anchas que corresponden principalmente a sobretonos y combinaciones de las vibraciones de tensión, que se producen en la región infrarrojo medio. La espectroscopia de infrarrojo cercano es menos útil para la identificación y

más útil para el análisis cuantitativo de compuestos que contengan grupos funcionales con hidrógenos unidos a carbonos, nitrógenos y oxígenos. Los coeficientes de absorptividad en esta región son pequeños, esta característica permite realizar el análisis sin necesidad de diluir las muestras en pastillas de KBr o emulsiones de nujol.

2.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS SÓLIDAS PARA ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA ^{20, 24-26}

2.2.1 Pastilla de KBr ²⁷

En trabajos cualitativos el método más común de obtener espectros de materiales sólidos, sin utilizar disolventes es la técnica de la pastilla de KBr. Este método consiste en moler finamente la sustancia problema y mezclarla con KBr en un mortero de ágata, posteriormente la mezcla se compacta en un "dado" formador de pastillas, y se obtiene una pastilla transparente. La pastilla se coloca directamente en el paso del haz infrarrojo del espectrofotómetro, el espectro se obtiene por transmisión a través de la pastilla.

Las características de esta técnica son las siguientes:

- * Requiere un "dado" formador de pastillas.
- * Es una técnica útil para obtener espectros de polvos y materiales granulados.
- * Utiliza cantidades pequeñas de muestra (1 a 3 mg).
- * El tiempo de preparación por muestra es de aproximadamente 5 min.
- * El tiempo de análisis por muestra es de aproximadamente 5 min.
- * El proceso de pulverización y prensado favorece los cambios a diferentes formas cristalinas del mismo material (cambios polifórmicos), también puede ocurrir intercambio iónico entre sales. Estos dos fenómenos generan espectros diferentes.
- * Cuando la muestra y el KBr no se mezclan uniformemente las bandas se distorsionan, particularmente las bandas de absorción fuerte se ensanchan.
- * La absorción de agua por el KBr puede distorsionar el espectro.

2.2.2 Suspensión ²⁷

Otra técnica para obtener espectros de polvos, consiste en pulverizar una pequeña cantidad del mismo (2 a 5 mg) en un mortero de ágata y mezclarlo bien con una o dos gotas de nujol o fluorolube, hasta formar una pasta que se coloca entre dos placas transparentes de NaCl o KBr sujetadas por un soporte metálico. También se pueden obtener espectros de sólidos a partir de películas delgadas de los mismos, por fusión y posterior solidificación o bien por disolución en un disolvente volátil que luego se evapora. Estas técnicas no son útiles en análisis cuantitativo, debido a que se requiere una medida precisa de la concentración. Para análisis cuantitativo se pueden obtener espectros de sustancias sólidas en fase de disolución.

El alcance y la versatilidad de la espectroscopia infrarroja como una herramienta analítica se ha incrementado debido a los diferentes accesorios de muestreo directo, útiles en el análisis cualitativo y cuantitativo. Algunos accesorios de muestreo directo para el análisis de polvos son: Accesorio de Reflectancia Total Atenuada y Accesorio Esfera de Integración. La descripción de cada uno de ellos y sus características se presentan a continuación.

2.2.3 Accesorio de Reflectancia Total Atenuada Horizontal con celda para polvos ²⁸

La muestra se pulveriza moderadamente para favorecer una distribución uniforme en la mezcla y se deposita sobre la superficie de la celda formada por un cristal de Selenuro de Zinc (ZnSe).

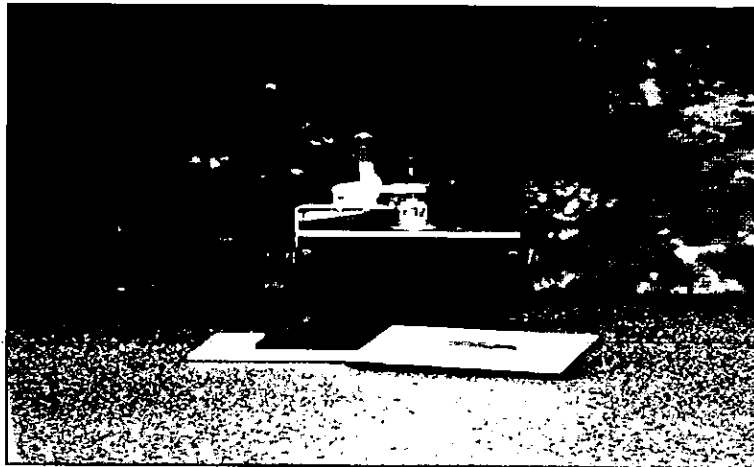


Figura 2.5: Accesorio de reflectancia total atenuada

El espectro se obtiene como sigue: El haz Infrarrojo procedente de la fuente entra en el cristal a la altura de la cara cortada a 45° , este material transmite el haz infrarrojo. El haz se refleja varias veces y con cada reflexión a lo largo del cristal, pasa una cantidad pequeña de radiación a la muestra, que se mantiene en contacto cercano con la superficie del cristal, por la acción de una prensa manual que ejerce presión. La profundidad de penetración del haz dentro de la muestra es de unas pocas micras, en la parte final del cristal, el haz se dirige a una serie de espejos antes de entrar al espectrofotómetro.

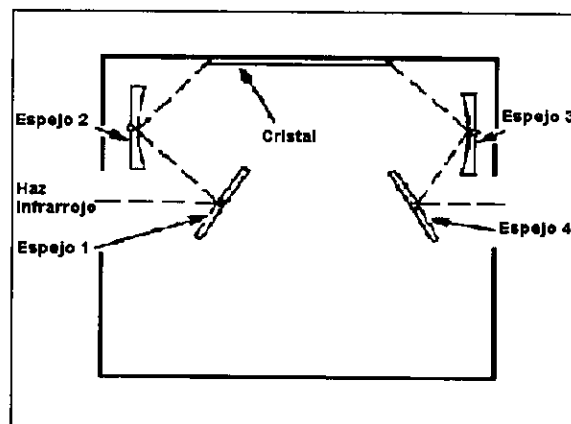


Figura 2.6: Diagrama óptico del accesorio de reflectancia total atenuada

Características del accesorio:

- * Esta técnica simplifica el análisis de pastas, geles, semi-sólidos, polvos, películas y líquidos viscosos.
- * Se pueden obtener espectros de cantidades muy pequeñas de material (aproximadamente 5 mg).
- * El tiempo de preparación por muestra es aproximadamente de 5 min.
- * El tiempo de análisis por muestra es de aproximadamente 5 min.
- * Es una técnica útil para el análisis cualitativo y cuantitativo.
- * Es un accesorio sencillo de manejar
- * La superficie de muestreo horizontal permite coleccionar espectros de infrarrojo fácilmente, con un mínimo de preparación de muestra, no se necesita ningún diluyente para la muestra lo que permite leer directamente el problema.
- * Debido a que el proceso de molienda y presión no es tan severo como en el caso de la pastilla de KBr, hay mucha menor posibilidad de que se presenten cambios polimórficos o modificaciones químicas.
- * Partículas de diferente tamaño en la muestra reducen el contacto de la muestra con el cristal lo que origina que el área de contacto entre la muestra y el cristal cambie de muestra a muestra.
- * Con el accesorio de reflectancia total atenuada no se puede obtener una presión reproducible y por tanto el área de contacto entre la muestra y el cristal cambia de muestra a muestra.
- * Las bandas de absorción fuerte se observan mejor en esta técnica que por la técnica de la pastilla de KBr.
- * En la superficie del cristal de ZnSe se pueden formar depósitos de residuos.
- * La superficie del cristal de ZnSe se destruye con sustancias abrasivas.

2.2.4 Accesorio Esfera de Integración ²⁹

Este accesorio está formado por una esfera hueca, cuya superficie interna se encuentra revestida con un polímero que tiene la propiedad de reflejar el haz infrarrojo, en las paredes de la esfera se encuentra insertado un detector de sulfuro de plomo de alta sensibilidad con un sistema de circuitos amplificadores que detectan todas las variaciones espectrales en la región infrarroja.

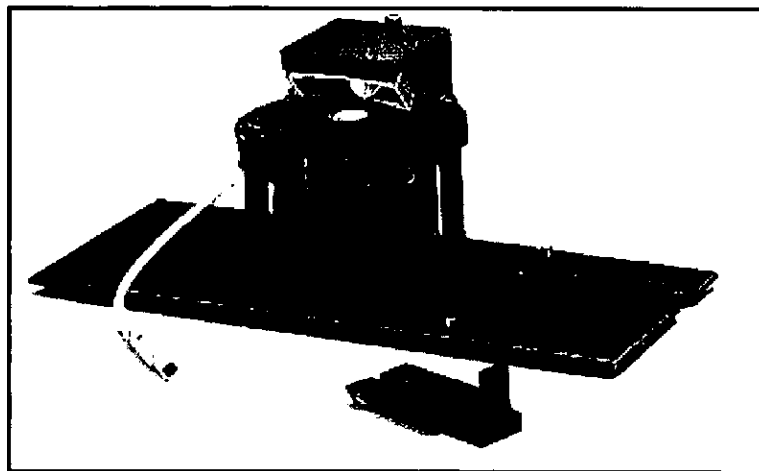


Figura 2.7: Accesorio esfera de integración

El espectro se obtiene por reflectancia difusa del haz infrarrojo: la muestra bien homogeneizada se deposita en una copa horizontal de 2 cm de diámetro y se introduce a la zona de lectura, el haz infrarrojo proveniente de la fuente entra a través de un puerto y choca con la muestra, la radiación se dispersa en forma difusa, se refleja muchas veces aleatoriamente dentro de la esfera, antes de ser registrada por el detector.

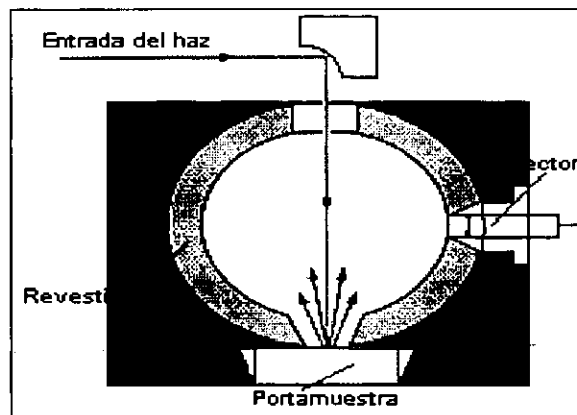


Figura 2.8: Diagrama óptico del accesorio esfera de integración

Características del accesorio:

- * El accesorio esfera de integración permite realizar mediciones de reflectancia difusa en el infrarrojo cercano de una amplia variedad de pastas, geles, semi-sólidos, polvos, materiales granulados y películas.
- * Se pueden obtener espectros de cantidades pequeñas de material, se requiere como mínimo 20 mg.
- * Requiere de poca preparación de muestra, permite medir casi todas las muestras sin diluir y en su estado original.
- * El tiempo de análisis por muestra es de aproximadamente 5 min.
- * Es accesorio un accesorio sencillo de manejar.
- * Es una técnica útil para el análisis cualitativo y cuantitativo.
- * El accesorio colecta los rayos reflejados en cualquier ángulo dentro de la esfera, sin presentar saturación de bandas en el espectro.
- * El tamaño de partícula no afecta. La copa de muestreo proporciona una área de contacto grande, que favorece reproducibilidad y repetibilidad en las mediciones, además reduce el error de muestreo en materiales no homogéneos y granulares. Lo que permite que el espectro sea representativo de la muestra.

- * Es más sensible que el accesorio de reflectancia total atenuada. Con el detector de sulfuro de plomo de alta sensibilidad es posible medir detalles espectrales muy pequeños que frecuentemente son características importantes para las mediciones cuantitativas en el infrarrojo cercano.
- * Este accesorio puede utilizarse tanto en la región infrarrojo cercano como en una parte de la región infrarrojo medio (4000 a 2700cm⁻¹) dando resultados repetibles en ambas regiones.

2.3 ANÁLISIS CUANTITATIVO ESPECTROFOTOMÉTRICO

El creciente interés en el análisis cuantitativo por espectroscopia infrarroja, se debe a la utilización de computadoras para procesar los datos espectroscópicos. Anteriormente, la espectroscopia de infrarrojo se utilizaba en análisis cuantitativo, en casos donde se determinaba un sólo componente y debía estar disponible una banda de absorción bien definida, que siguiera la ley de Lambert-Beer. Actualmente, es posible realizar el análisis cuantitativo de sistemas donde están presentes varios componentes, aun cuando las bandas de los componentes se empalman. Para realizar este tipo de análisis es necesario resolver una serie de ecuaciones en forma ordenada para calcular las concentraciones. Esto es un proceso matemático largo, sin embargo, una computadora con el apropiado "software" puede ejecutar estos cálculos en forma rápida y exacta.

2.3.1 MÍNIMOS CUADRADOS CLÁSICOS ^{25, 30, 31, 35}

La ley de Lambert-Beer es la base del análisis cuantitativo espectroscópico, esta ley establece una relación lineal entre la absorbancia y la concentración del componente de interés. La ley de Lambert-Beer para una longitud de paso óptico constante, se escribe como:

$$A_{\lambda} = K_{a,\lambda} C_a$$

En donde:

A_{λ} es la absorbancia en una longitud de onda dada.

$K_{a,\lambda}$ es el coeficiente de absortividad para el componente a , en la longitud de onda λ .

C_a es la concentración de la muestra.

Para resolver esta ecuación, se mide la absorbancia de una muestra de concentración conocida, y se obtiene el coeficiente de absortividad, $K_{a,\lambda}$. Debido a ruido, errores instrumentales, errores en el manejo de las muestras, y

muchas otras variables, es mejor medir la absorbancia de una serie de concentraciones diferentes, y ejecutar una Análisis de Regresión de Mínimos Cuadrados para calcular la pendiente (coeficiente de absortividad) de la mejor línea recta que pasa a través de todos los puntos de datos.

Al ejecutar un Análisis de Regresión de Mínimos Cuadrados se debe utilizar una banda aislada para el componente de interés y calcular una ecuación para dicho componente. Una vez que la ecuación se calcula, la concentración de este componente en las muestras problema se obtiene al substituir la absorbancia de la banda, en la ecuación correspondiente. La predicción de muestras problema presentará errores si hay componentes interfiriendo con el componente de interés, debido a que en este análisis se asume que la absorbancia corresponde a un sólo componente.

El problema es más complejo sí las muestras contienen más de un componente, puesto que es necesario tener tantas ecuaciones como componentes estén presentes.

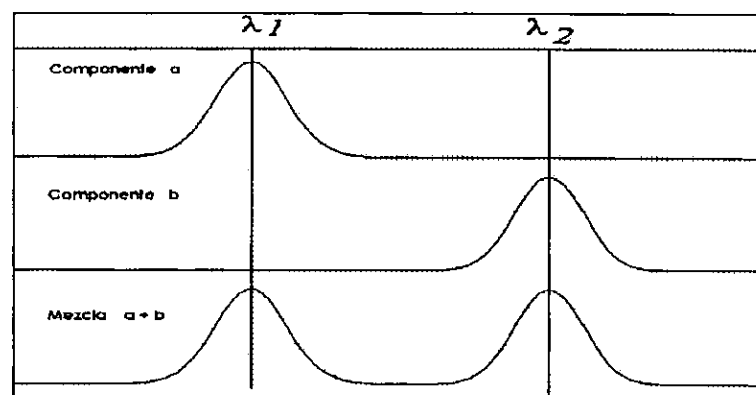


Figura 2.9: Espectros de dos componentes puros a, b y una mezcla de ambos.

Debido a que, los espectros de los dos componentes puros en la figura 2.9 no se traslapan, es necesario formular dos ecuaciones, una para cada componente, en las longitudes de onda seleccionadas:

$$A_{\lambda_1} = K_{a,\lambda_1} C_a$$

$$A_{\lambda_2} = K_{b,\lambda_2} C_b$$

En donde:

A_{λ_1} y A_{λ_2} Absorbancias en las dos diferentes longitudes de onda.

K_{a,λ_1} y K_{b,λ_2} Coeficientes de absortividad para los dos componentes en las dos longitudes de onda seleccionadas.

C_a y C_b Concentraciones de los componentes a y b en las mezclas.

Estas ecuaciones asumen que la absorbancia en la longitud de onda 1 se debe únicamente al componente a y la absorbancia en la longitud de onda 2 se debe únicamente al componente b, es decir, se requieren dos longitudes de onda, para representar a los dos componentes. Se puede resolver cada una de estas ecuaciones independientemente, sí la absorbancia de un componente no interfiere con la absorbancia del otro, es decir, sí las bandas están bien definidas y suficientemente separadas una de la otra.

En trabajos de rutina, es difícil tener bandas bien definidas en diferentes longitudes de onda. Sin embargo, es posible tomar ventaja de otra parte de ley de Lambert-Beer, *absorbancias de diferentes componentes en la misma longitud de onda son aditivas.*

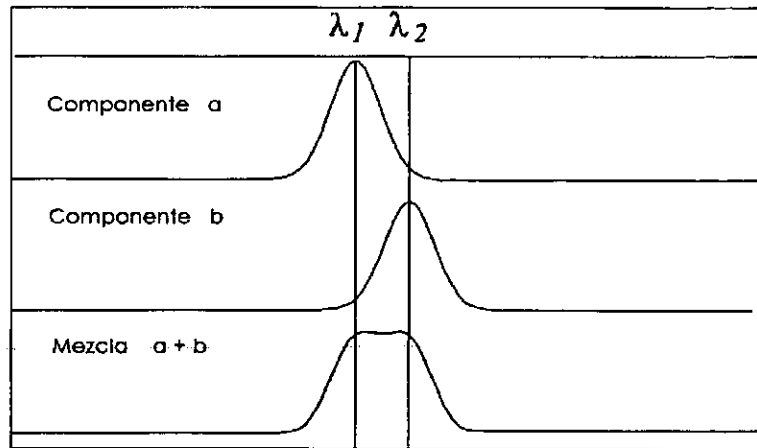


Figura 2.10: Espectros de dos componentes puros **a**, **b** y una mezcla.

En este caso, los espectros se traslapan y las ecuaciones se deben resolver simultáneamente para **a** y **b**. Así, las dos ecuaciones para los espectros de la figura 2.10 serán:

$$A_{\lambda_1} = K_{a,\lambda_1} C_a + K_{b,\lambda_1} C_b$$

$$A_{\lambda_2} = K_{a,\lambda_2} C_a + K_{b,\lambda_2} C_b$$

Debido a que no existen resultados cuantitativos válidos si no van acompañados de alguna estimación de los errores inherentes a ellos, es necesario corregir las ecuaciones para que reflejen los errores (ruido, errores instrumentales, errores en el manejo de las muestras, etc.) presentes en el cálculo:

$$A_{\lambda_1} = K_{a,\lambda_1} C_a + K_{b,\lambda_1} C_b + E_{\lambda_1}$$

$$A_{\lambda_2} = K_{a,\lambda_2} C_a + K_{b,\lambda_2} C_b + E_{\lambda_2}$$

En donde:

E_{λ_1} y E_{λ_2} Son los errores residuales entre la línea de ajuste de mínimos cuadrados y las absorbancias actuales. Los errores se reflejan en las absorbancias espectrales.

Los errores serán iguales a cero cuando se ajustan únicamente dos muestras estándar, sin embargo, se deben correr muchas más muestras estándar, en lugar de sólo dos. Conceptualmente, se puede medir más de una longitud de onda para cada componente y resolver una ecuación para cada uno, el problema se presenta al resolver todas estas ecuaciones. Una forma de resolver ecuaciones simultáneas es utilizar álgebra de matrices. Esta técnica, requiere muchos cálculos, pero son rápidos de resolver por computadora. Para dos muestras, dos componentes y dos longitudes de onda, las ecuaciones son:

Para espectro No. 1: $A_{11} = K_{11} C_{11} + K_{12} C_{21} + E_{11}$

Para espectro No. 2: $A_{21} = K_{21} C_{11} + K_{22} C_{21} + E_{21}$

En términos de matriz, las ecuaciones anteriores se escriben como:

$$A = K C + E_e$$

En donde:

La matriz **A** contiene los espectros de cada una de las mezclas estándar.

La matriz **K** contiene los coeficientes de absortividad para cada uno de los componentes en las longitudes de onda seleccionadas.

La matriz **C** contiene las concentraciones de todos los componentes para cada uno de los espectros.

La matriz **E** contiene los errores medidos aleatoriamente en los espectros.

Mediante el ajuste de Mínimos Cuadrados se obtiene la matriz **K** (matriz de coeficiente de absortividad), en la ecuación de arriba. Una vez que la ecuación se resuelve para la matriz **K**, ésta se utiliza para calcular concentraciones de muestras desconocidas.

Este método de análisis cuantitativo se conoce como Matriz **K** o Mínimos Cuadrados Clásico, tiene como principal ventaja alta precisión debido a que considera el espectro completo, con un número grande de frecuencias. Una

desventaja de esta técnica es que la calibración debe incluir todos los componentes presentes en la mezcla, los componentes ignorados interferirán en el análisis y darán resultados incorrectos. La técnica de Mínimos Cuadrados Clásicos sólo es útil en sistemas en donde se conoce el número de componentes en las mezclas, la concentración de todos ellos en las mezclas y los espectros de los componentes puros.

2.3.2 DESCOMPOSICIÓN DE DATOS POR MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLS1) ^{30, 32, 33, 34}

En el caso tratado hasta aquí, es decir, una mezcla de dos componentes, sólo hay dos variables independientes en el sistema, es decir, el componente **a** y el componente **b**. El espectro de la mezcla formada por ambos componentes se puede reproducir si se suman fracciones de los espectros de los componentes puros. Aunque en problemas reales existen nuevas variables producidas por: el procedimiento de muestreo, el uso del instrumento, diferencias en las propiedades físicas de las muestras, diferencias en la composición química de las muestras, interacciones entre los componentes puros que forman la muestra, y un número finito de variables independientes.

Esta técnica de descomposición espectral, se encarga de identificar las principales variables en todos los espectros de la curva de calibración y obtiene un "espectro" de cada una de ellas. Estos "espectros" no son semejantes a los espectros reales, son una representación matemática de todas las variables presentes en los datos.

Este grupo de "espectros" matemáticos se conocen como factores. Cada espectro del grupo original de datos se reconstruye multiplicando cada factor por una fracción escalar y los resultados se suman hasta que el espectro en construcción coincida con el espectro original. Las fracciones se

conocen como **escores**, es decir, cuanto de cada factor se necesita para reconstruir el espectro original.

Este proceso reduce grandemente la complejidad de los datos, de tal forma que con un número pequeño de factores y escores se puede reconstruir cualquier espectro de una muestra desconocida. Esta colección de escores y factores se conoce también como un modelo para los datos de la curva de calibración. Cada espectro de calibración tendrá su propio y único grupo de escores, pero el mismo grupo de factores, puesto que siempre se utilizan los mismos factores para modelar los espectros de calibración. Así, cada espectro se puede representar por una serie de escores, en el espacio factor, en lugar de una serie de intensidades, en el espacio longitud de onda. Esta forma totalmente diferente de representar una serie de espectros, dispone de un modelo matemático, el cual inicia con un grupo de espectros que representan la composición de las muestras de la curva de calibración y procede como sigue:

1. Calcula el espectro promedio de todos los espectros de calibración.
2. Compara cada espectro de la curva de calibración con el espectro promedio y obtiene un nuevo espectro que refleja las diferencias entre los dos primeros. Éste, es el primer factor. El primer factor es un promedio aproximado de todos los espectros originales.
3. Calcula la cantidad del primer factor en cada espectro de la curva de calibración. Los valores resultantes son los escores de las muestras para este factor.
4. Calcula la contribución de los factores (factor veces el escore) en cada espectro en la curva de calibración y substraer esta contribución de cada espectro de calibración.

5. Los datos de calibración resultantes los utiliza en lugar de los datos originales. Entonces, regresa al paso 1 y repite el proceso. Hasta que se calcula un número específico de factores.

En resumen, la descomposición espectral consiste en hallar una serie de factores para reproducir los espectros de la curva de calibración, combinándolos en diferentes proporciones.

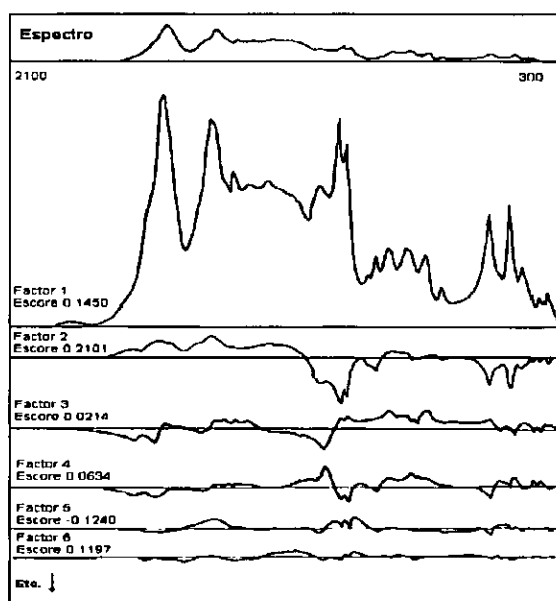


Figura 2.11: El esquema muestra la descomposición espectral
Un espectro junto con los 6 primeros factores y escores

Después de ejecutar la descomposición espectral, se correlacionan los escores y las concentraciones de las muestras de la curva de calibración mediante regresión lineal múltiple, para producir un grupo de coeficientes de regresión. Este grupo de coeficientes de regresión se utiliza para predecir las concentraciones de muestras desconocidas, partiendo únicamente de los espectros. En una regresión lineal normal, las absorbancias se regresionan

contra las concentraciones. En una regresión lineal múltiple, los scores se regresionan contra las concentraciones.

2.4 DISEÑO EXPERIMENTAL SIMPLEX ^{35, 36}

La preparación de un método demanda que el analista adquiera buenos datos espectrales de un grupo de muestras bien seleccionadas. En experimentos con mezclas, en donde se varían las proporciones de los diferentes componentes y se mantiene fija la cantidad total de muestra, es conveniente utilizar el diseño experimental simplex para establecer la estrategia de muestreo. Este tipo de diseño experimental permite variar aleatoriamente las concentraciones, dentro del intervalo establecido para cada componente. Por ejemplo, en un sistema formado por 3 componentes: T, S y E. El diseño simplex se construye como sigue:

1. Las concentraciones de los componentes se ajustan a un 100 %, es decir: $\% T + \% S + \% E = 100 \%$. Lo importante es variar las proporciones de los componentes en las mezclas, y no la cantidad de la mezcla.
2. Se dibuja un triángulo equilátero. Cada vértice del triángulo se toma como un punto de referencia para un 100% del componente con que se designa. Los lados del triángulo representan diferentes proporciones de los constituyentes en los sistemas de dos componentes y cualquier mezcla compuesta de T, S, y E debe quedar dentro del diagrama.
3. Para obtener otras concentraciones de T se dividen los lados TS y TE en 10 partes iguales y se dibujan líneas paralelas a SE, cada una de estas líneas representa un porcentaje de T que varía desde cero, sobre la línea SE hasta 100% en T.

4. Análogamente, se dividen los lados ST y SE en 10 partes iguales y se dibujan líneas paralelas a TE, cada una de estas líneas representa un porcentaje de S. Mientras que las líneas trazadas a lo largo de los dos lados ET y ES, paralelas a TS representan los diversos porcentajes de E.

5. Para leer un punto cualquiera sobre el diagrama, por ejemplo: Se localiza primero la línea de T y nos colocamos sobre la horizontal 30%, luego la de 20% de S, la intersección de estas dos líneas nos da un punto que se encuentra sobre la línea de 50% para E. De este modo, se localiza el punto (30% de T, 20% de S, 50% E).

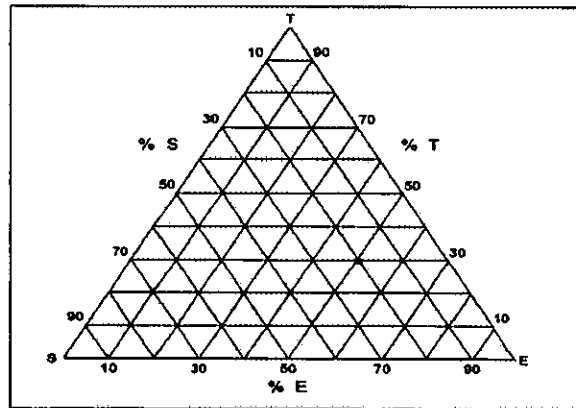


Figura 2.12: Diagrama del diseño simplex

2.5 DESCRIPCIÓN DEL SOFTWARE QUANT+ ^{19, 37, 38}

El paquete de software QUANT+ está diseñado para realizar el análisis cuantitativo de sistemas multicomponentes, mediante técnicas quimiométricas y regresión lineal múltiple. Estas técnicas establecen una relación entre los espectros y las concentraciones de los estándares que forman la curva de calibración. Posteriormente, esta relación se utiliza para "predecir" las concentraciones de los componentes de las muestras problema.

Este paquete de "software" puede utilizar información del espectro entero o seleccionar algunas frecuencias, puede determinar el error asociado con el análisis e identificar estándares erróneos. Las etapas que intervienen en un análisis QUANT+ son las siguientes:

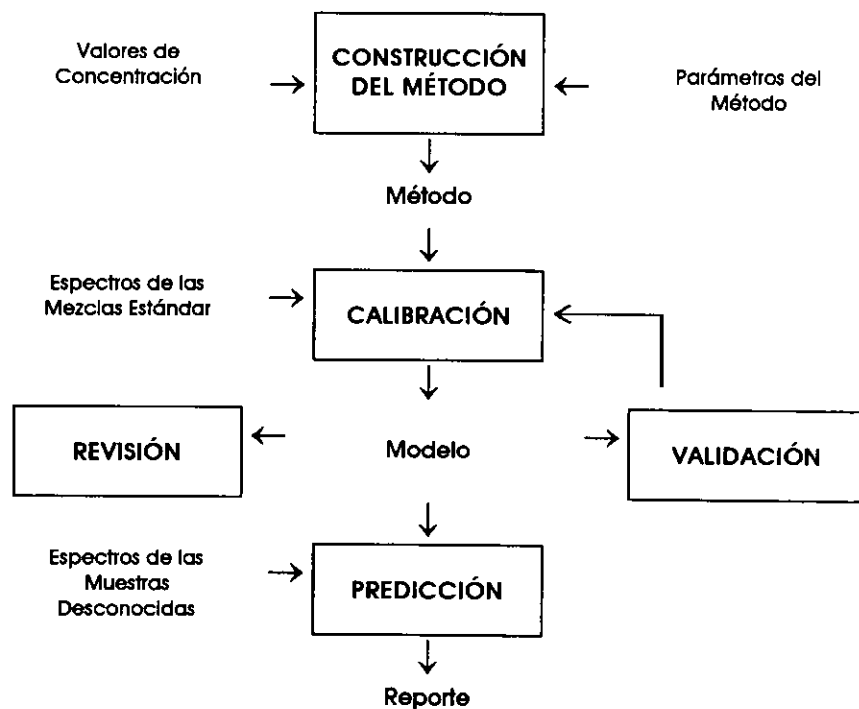


Figura 2.13: Etapas de un análisis Quant+

2.5.1 CONSTRUCCIÓN DEL MÉTODO

En esta etapa se describe el método y se especifican todos los parámetros necesarios para ejecutar la calibración y posterior predicción, como son: condiciones espectrales, opciones de preproceso (intervalo espectral, suavización, normalización, corrección de línea base, etc.) y el algoritmo cuantitativo a utilizar. También se registran los espectros de los estándares de calibración y sus concentraciones.

2.5.2 CALIBRACIÓN

La parte más importante de un análisis Quant+ es la calibración. El siguiente esquema muestra las etapas que intervienen en la calibración:

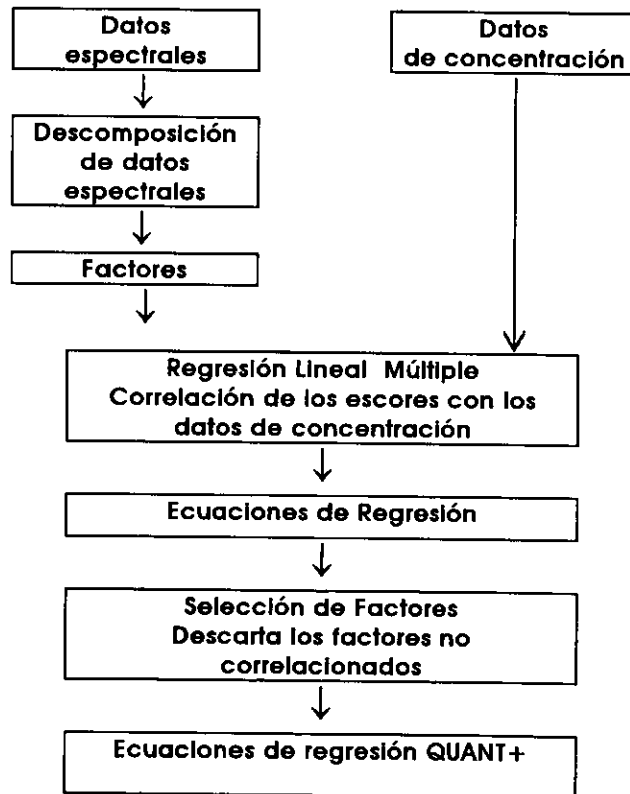


Figura 2.14: Etapas de una calibración Quant+

El punto de inicio de la calibración es un grupo de muestras estándar, el cual se divide en dos grupos: datos espectrales, que son los espectros de las muestras estándar y datos de concentración, que son las concentraciones de las especies de interés en las muestras estándar.

El "software" QUANT+ utiliza las técnicas de descomposición de datos Regresión de Componentes Principales (PCR+, por sus siglas en inglés) o Mínimos Cuadrados parciales (PLS, por sus siglas en inglés) para reducir cada espectro a un pequeño número de factores y un grupo de scores, necesarios para representar todas las variaciones presentes en la curva de calibración. Mediante regresión lineal múltiple (MLR, por sus siglas en inglés) establece las correlaciones entre los scores y las concentraciones de cada especie de los estándares de calibración.

El "software" QUANT+ genera una ecuación de regresión para cada especie de interés. Posteriormente, optimiza las ecuaciones de regresión. Para cada propiedad hay algunos factores que muestran pequeña correlación, estos factores se eliminan uno a la vez, y la regresión se repite con el grupo reducido de factores. La iteración continúa hasta que todos los factores sobrantes muestran una correlación importante, sólo aquellos factores que son estadísticamente significativos para la regresión se utilizan en las ecuaciones de regresión final. Esto lleva a una mayor simplificación del modelo.

Posteriormente, se realiza la "predicción" de las propiedades de interés en las muestras problema; que consiste en ajustar las cantidades de cada factor en el espectro problema y utilizar éstas en las ecuaciones de regresión.

2.5.3 VALIDACIÓN

Los procedimientos matemáticos que utiliza el "software" QUANT+ para realizar la validación no son los mismos que se utilizan en una validación clásica. Es decir, no realiza la validación del método analítico, realiza la validación de la predicción del método quimiométrico.

En esta etapa se comprueba la capacidad del modelo para analizar muestras desconocidas después que se calibra el método. La validación, indica si el modelo generado por la calibración proporcionará una adecuada predicción de las muestras problema, bajo las condiciones adoptadas en el método.

Idealmente, el modelo de calibración se debe probar con un grupo independiente de muestras de validación, las cuales se extienden en el mismo intervalo que los estándares de calibración, este tipo de validación se conoce como validación independiente.

Cuando no hay suficientes muestras disponibles para la validación independiente, se dispone de una aproximación alternativa que es la validación "cross". En este tipo de validación, cada estándar en turno se elimina, de la calibración y se predice sobre una calibración ejecutada con las muestras remanentes. La validación siempre involucra la predicción de muestras no incluidas en la curva de calibración.

2.5.4. REVISIÓN

Una vez que el método ha sido calibrado, el "software" evalúa los resultados obtenidos, para identificar problemas potenciales con la calibración y asegurar la calidad de los modelos de regresión generados. La revisión es de tipo gráfica.

2.5.5 PREDICCIÓN

Una vez que se obtienen las ecuaciones de regresión para una propiedad, se realiza el análisis de las muestras problema, para probar el método se utilizan muestras de composición conocida. El análisis se lleva a cabo determinando los scores para el espectro de la muestra problema y substituyendo estos dentro de las ecuaciones de regresión. El procedimiento de predicción consiste en especificar el nombre del archivo o lista de nombres de archivos si hay más de una muestra problema.

CAPÍTULO 3

DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS FÁRMACOS ^{39, 40}

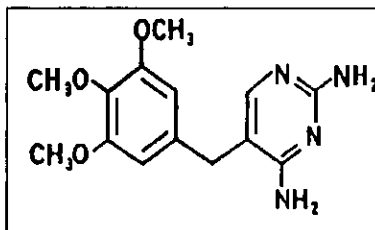
3.1.1 TRIMETOPRIM

Nombre genérico: Trimetoprim

Nombre químico: 5 - [(3,4,5 - trimetoxifenil) metil] - 2 - 4 pirimidinadiazina

Formula condensada: $C_{14}H_{18}N_4O_3$

Formula estructural:



Peso Molecular: 290.32 g/mol

Punto de Fusión: 199 - 203 °C

Descripción: Polvo cristalino, blanco, inodoro.

Usos: Antibacterial

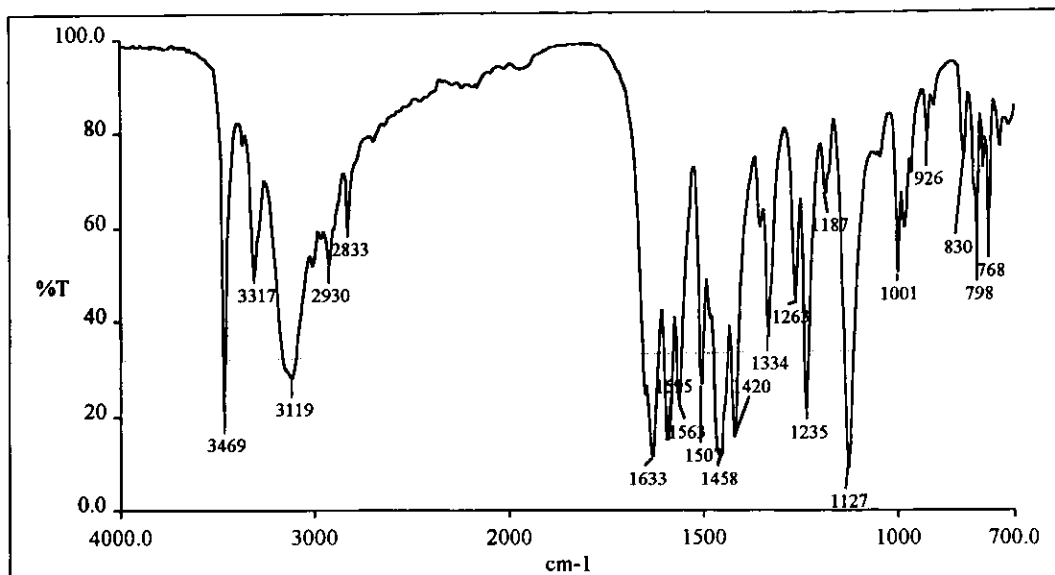


Figura 3.1: Espectro de Trimetoprim en la región infrarrojo medio

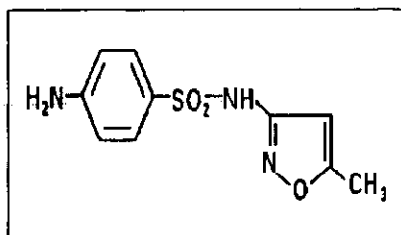
Interpretación del espectro

Número de onda	Grupo funcional	Tipo de vibración
2970, 2930, 2833	-CH ₃ , -CH ₂	Tensión
1458	-CH ₃ , -CH ₂	Deformación
3012	Aromático	Tensión -C-H
2060-1860	Sobretonos	Sobretonos de vibraciones fundamentales que se observan a bajas frecuencias
1595, 1563, 1507	Aromático	Tensión del anillo aromático
830	Sustitución	Sustitución 1,2,3,5
3469, 3317	-NH ₂	Tensión
1633	-NH ₂	Deformación (tijera)
1235, 1127	Ar-O-C	Tensión -C-O-C

Tabla 3.1: Bandas principales

3.1.2 SULFAMETOXAZOL

Nombre genérico: Sulfametoxazol
Nombre químico: 4 - Amino - N - (5 - metil-3 isoxazolil)
bencensulfonamida.
Formula condensada: $C_{10}H_{11}N_3O_3S$
Formula estructural:



Peso Molecular: 253.28 g/mol
Punto de Fusión: 168 -172 °C
Descripción: Polvo cristalino, blanco, inodoro.
Uso: Antibacterial

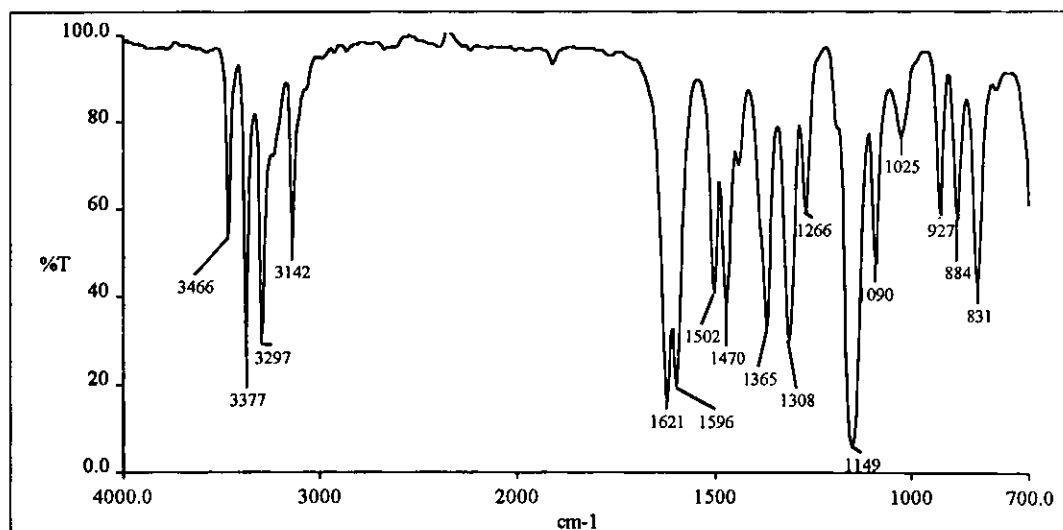


Figura 3.2: Espectro de Sulfametoxazol en la región infrarrojo medio

Interpretación del espectro

Número de onda	Grupo funcional	Tipo de vibración
3100	Aromático	Tensión -C-H
1960-1700	Sobretonos	Sobretonos de vibraciones fundamentales que se observan a bajas frecuencias
1596, 1502, 1470	Aromático	Tensión del anillo aromático
831	Sustitución	P-Sustitución
3466, 3377	-NH ₂	Tensión
3297	-NH ₂	Tensión
1308	-NH ₂	Tensión
1621	-NH ₂	Deformación (tijera)
1308, 1149	-C-SO ₂ -N	Tensión -SO ₂

Tabla 3.2: Bandas principales

3.1.3 MEZCLA COMERCIAL

Nombre comercial: Bactrim, Ectaprim, Isobac.

Principios activos: Trimetoprim y Sulfametoxazol.

Excipiente: Avicel, Acdisol, Ácido Estearico, Estearato de Magnesio, Plasdone, Polisorbato.

Laboratorios que lo fabrican: Carnot, Liomont, Química Son's, Roche.

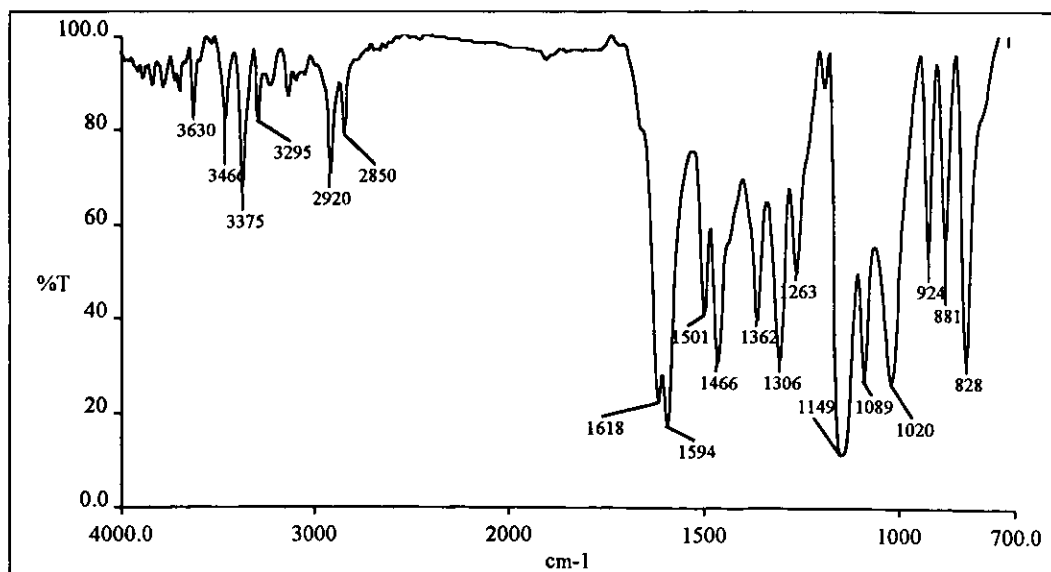


Figura 3.3: Espectro de la mezcla comercial en la región infrarrojo medio

3.2 SELECCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE PROCESAMIENTO DE DATOS DEL ESPECTROFOTÓMETRO FTIR ⁴¹

En la realización de un análisis cuantitativo es necesario obtener buenos datos espectrales tanto de las muestras estándar, que forman la curva de calibración, como de las muestras problema. Para esto es necesario identificar los parámetros de procesamiento de datos del espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier, que permiten obtener los mejores espectros.

En este estudio, todos los espectros se obtuvieron en un espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier Sistema 2000 Perkin Elmer con detector de sulfuro de plomo y DTGS (sulfato deuterado de triglicina) con divisor de bromuro de potasio para un intervalo espectral de 6500 cm^{-1} a 370 cm^{-1} , equipado con esfera de integración Labsphere inc. La adquisición de datos se realizó con una computadora Hewlett Packard de 200 Mhz, disco duro de 2000 MB, monitor UVGA, con "software" Manejo de Datos de Infrarrojo y Quant +.

Para seleccionar los parámetros espectrales óptimos se utilizó el espectro del Sulfametoxazol como sustancia de referencia. Los parámetros espectrales son los siguientes: Rango, Resolución y Número de Barridos.

3.2.1 Intervalo ^{42, 43}

El intervalo es la región del espectro sobre el cual se colectan los espectros. Para establecer el intervalo espectral se corrieron los espectros de todas las materias primas en la región infrarroja media (4400 a 400 cm^{-1}) y en la región infrarrojo cercano (6500 a 3700 cm^{-1}).

Posteriormente se utilizó la función COMPARE para estimar que tan similares son los espectros de las materias primas, en cada una de las regiones. El espectro de cada materia prima se comparo contra el espectro de Sulfametoxazol en la misma región y se analizó que tan iguales son, sobre la base de la correlación matemática (100 % indica que son iguales, 0% no hay igualdad).

Referencia: Sulfametoxazol 100%

COMPONENTE	CORRELACIÓN INFRARROJO CERCANO 6500 a 3700 cm^{-1} %	CORRELACIÓN INFRARROJO MEDIO 4400 a 400 cm^{-1} %
Sulfametoxazol	100	100
Trimetoprim	11,53	16,15
Talco	9,74	1,88
Estearato de Mg	8,35	0,58
Plasdone	7,25	90,82
Ácido Estearico	4,83	2,88
Acdisol	2,33	99,72
Avicel	1,45	15,8
Polisorbato	0,28	4,49

Tabla 3.3: Tabla de correlaciones

Se busca una región en donde las diferencias entre los componentes sean mayores, en la región media Plasdone y Acdisol tienen una semejanza de más del 90% con Sulfametoxazol. Es decir, se pueden confundir Plasdone y Acdisol con Sulfametoxazol. En la región infrarrojo cercano ninguno de los componentes presenta semejanza con Sulfametoxazol, fácilmente se establecen las diferencias entre todos los componentes. Lo anterior se visualiza en la figura 3.4.

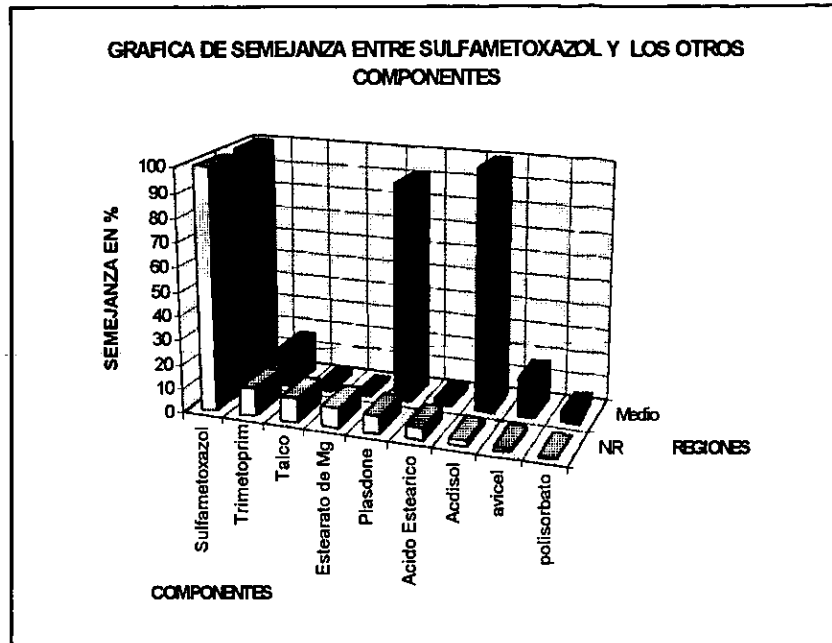


Figura 3.4: Gráfica de semejanza entre Sulfametoxazol y los restantes componentes, en las regiones infrarrojo cercano e infrarrojo medio

Por lo anterior, se estableció la región infrarrojo cercano (6500 a 3700 cm^{-1}) como región de trabajo.

3.2.2 Resolución

La Resolución, es la capacidad del espectrofotómetro para distinguir longitudes de onda o frecuencias espectrales vecinas. Una elección cuidadosa de la resolución permite eliminar ruido sin quitar información espectral. Las opciones a modificar son las siguientes: 2, 4, 6, 8 cm^{-1} .

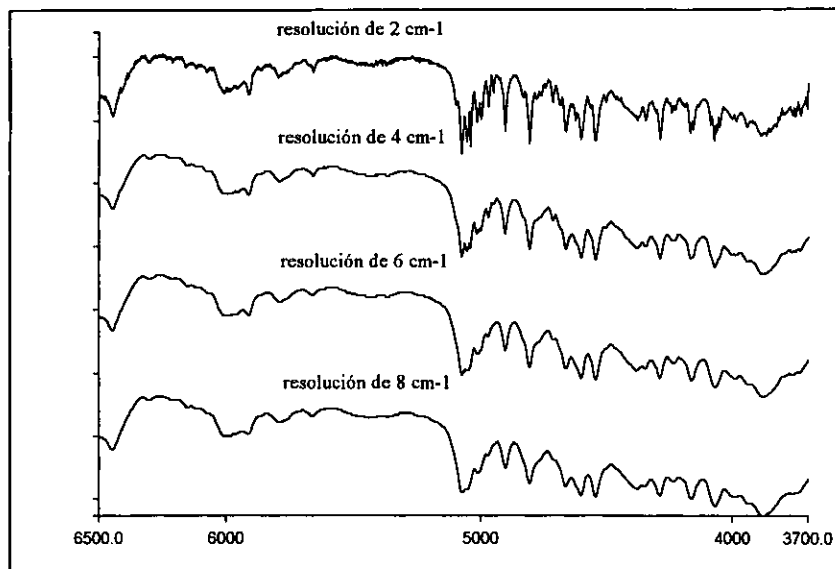


Figura 3.5: Espectro de Sulfametoxazol en diferentes valores de resolución

Los espectros con resolución de 8 cm^{-1} y 6 cm^{-1} son poco ruidosos pero presentan bandas que no están bien definidas. El espectro con resolución de 2 cm^{-1} es demasiado ruidoso. Cuanto más pequeño es el valor de resolución el ruido es mayor. El espectro con resolución de 4 cm^{-1} presenta bandas bien definidas y es el que presenta menor ruido. Por lo anterior, el valor seleccionado para la resolución fue de 4 cm^{-1} .

3.2.3 Número de Barridos

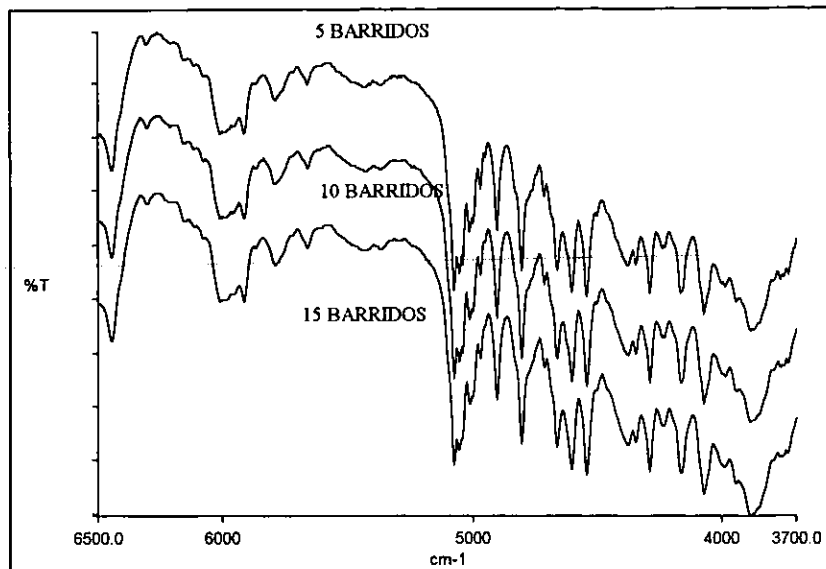


Figura 3.6: Espectro de Sulfametoxazol a diferente número de barridos

La figura 3.6 muestra el espectro de Sulfametoxazol utilizando 5, 10 y 15 barridos. Los tres espectros no presentaron diferencias importantes y por tanto se tomo el mínimo número de barridos, para optimizar el tiempo de análisis.

Los espectros que se utilizan en métodos cuantitativos quimiométricos no se les debe aplicar corrección de línea base o suavización, y en general ninguna operación matemática que modifique el tamaño del espectro, debido a que el "software" QUANT+ realiza este trabajo.

3.3 CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN ^{30, 44, 45}

A continuación se explica la serie de pasos que se siguen en la construcción de la curva de calibración.

1. Se establece el número de compuestos que intervienen en el análisis, el número de compuestos que se cuantifican y el número mínimo de estándares necesarios en la curva de calibración, esto es: en el presente análisis intervienen 2 compuestos activos (Trimetoprim y Sulfametoxazol) y 7 compuestos formando el excipiente (Avicel, Plasdone, Polisorbato, Talco, Ac-di-sol, Ácido Estearico y Estearato de magnesio), es decir, un total de 9 compuestos, de los cuales sólo se determinan los dos compuestos activos (Trimetoprim y Sulfametoxazol). El número mínimo de estándares que necesita la calibración del "software" QUANT+, es igual a tres veces el número de componentes que intervienen en el análisis, es decir, si se tienen 9 componentes en total, se necesitarán como mínimo 27 estándares en la curva de calibración, aún cuando sólo se cuantifiquen dos de ellos.
2. Los estándares de la curva de calibración son mezclas de composición similar a las muestras problema. Se preparan mezclas de trimetoprim, sulfametoxazol y excipiente. Las concentraciones de los tres componentes se ajustan a un 100 % del peso de la tableta.
3. Se establece el intervalo de concentración en el que cada uno de los componentes que se determina, debe variar, en la curva de calibración.
 - a) Las especificaciones del producto comercial, según el certificado de análisis proporcionado por laboratorios Carnot, son las siguientes:

Nombre genérico	Trimetoprim y Sulfametoxazol tableta
Peso promedio de la tableta	605 mg
Cantidad de Trimetoprim por tableta	80 mg
Cantidad de Sulfametoxazol por tableta	400 mg

Tabla 3.4: Tabla de especificaciones del producto comercial

b) Se calcula el porcentaje, que representa cada uno de los componentes de interés, en la tableta. Así, se tiene que:

80 mg de Trimetoprim representan el 13.2231 % de la tableta.

400 mg de Sulfametoxazol representan el 66.1157 % de la tableta.

c) En el presente análisis se estableció el intervalo de calibración de 60% a 120% de la cantidad de activo presente en la tableta, de acuerdo a lo establecido en la Guía de Procedimientos Adecuados de Laboratorio Analítico de CIPAM (Comisión Interinstitucional de Practicas Adecuadas de Manufactura).

Para trimetoprim

El 60% (intervalo de calibración) del 13.2231 (mg de trimetoprim/ 100 mg tab) es 7.9339 %.

El 120% (intervalo de calibración) de 13.2231 (mg de trimetoprim/ 100 mg tab) es 15.8677 %.

De esta forma, el intervalo de calibración calculado se encuentra entre 7.9339 % y 15.8677 %.

Para sulfametoxazol

El 60% (intervalo de calibración) de 66.1157 % (mg de sulfametoxazol/ 100 mg tab) es 39.6694 %.

El 120% (intervalo de calibración) de 66.1157 % (mg de sulfametoxazol/ 100 mg tab) es 79.3388 %.

De esta forma, el intervalo de calibración calculado se encuentra entre 39.6694

% y el 79.3388 %.

- d) Se selecciona el peso de cada uno de los estándares. El peso total de cada estándar es de 2 g.
- e) Se debe evitar colinearidad en la curva de calibración. La colinearidad ocurre cuando la concentración de un componente en la mezcla varía como una función constante de otro componente. Por ejemplo, cuando la concentración de un componente se incrementa siempre que la concentración del otro decrece en la misma cantidad. Cuando esta situación ocurre, la descomposición espectral no puede establecer diferencias entre los dos componentes en el set de calibración, y por consiguiente, encuentra una sola variable, esto lleva a calibraciones malas y consecuentemente predicciones con errores. Para evitar estos problemas, y debido a que no se disponía de un diseño experimental apropiado, la curva de calibración se construyó de la siguiente forma: la concentración de trimetoprim aumenta conforme se incrementa el número de estándar dentro del intervalo calculado, la concentración de sulfametoxazol se distribuye al azar dentro del intervalo calculado, y finalmente la concentración de excipiente es la cantidad necesaria para que las tres concentraciones sumen 100%. Finalmente, la curva de calibración experimental para trimetoprim se encuentra entre 1.6500 % y 17.9500 %, mientras que la curva de calibración experimental para sulfametoxazol se encuentra entre 59.1016 % y 97.3510 %.

3.4 PREPARACIÓN DE MUESTRAS ³⁰

3.4.1 MATERIAS PRIMAS

Se secó cada uno de los excipientes y principios activos, en la estufa.

- a) Cada materia prima se colocó en un mortero de ágata y con el pistilo se pulverizó con movimientos rotatorios, firmes y vigorosos.

- b) Después de la molienda, el pulverizado se pasa a través de una malla del número 60, con el fin de tener un tamaño de partícula uniforme.
- c) Las materias primas se colocaron a un frasco etiquetado y se almacenaron dentro de un desecador conteniendo sílica gel con indicador de humedad.

3.4.2 MUESTRAS ESTÁNDAR

- a) Se pesaron cuidadosamente los excipientes y principios activos para cada una de las muestras estándar, de acuerdo al diseño de la curva de calibración
- b) Cada muestra estándar se molió vigorosamente, para que presente una distribución adecuada del tamaño de partícula y se evite la estratificación de los componentes.
- c) Las muestras estándar se colocaron en un frasco etiquetado y se almacenaron dentro de un desecador conteniendo sílica gel con indicador de humedad.

3.4.3 MUESTRAS PROBLEMA

- a) Por cada lote se utilizaron 20 tabletas, se pesó cada una de las tabletas y se calculó el peso promedio.
- b) Se trituraron hasta polvo fino las 20 tabletas y se homogeneizaron vigorosamente.
- c) El pulverizado se pasa a través de una malla del número 60 con el fin de tener un tamaño de partícula uniforme.
- d) El polvo representativo de cada lote se colocó en un frasco etiquetado y se almacenó dentro de un desecador que contiene sílica gel con indicador de humedad.

3.5 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO

Se realizó el análisis espectroscópico de las muestras estándar y de las muestras problema, utilizando las mismas condiciones instrumentales en los dos casos.

3.6 CONSTRUCCIÓN DEL MODELO DE CALIBRACIÓN

1. Se guardan los espectros de las muestras estándar en el disco duro de la computadora en que se encuentra instalado el "software" QUANT +.
2. Se selecciona el icono correspondiente al programa QUANT+ en el administrador de programas. Se abre la pantalla principal.

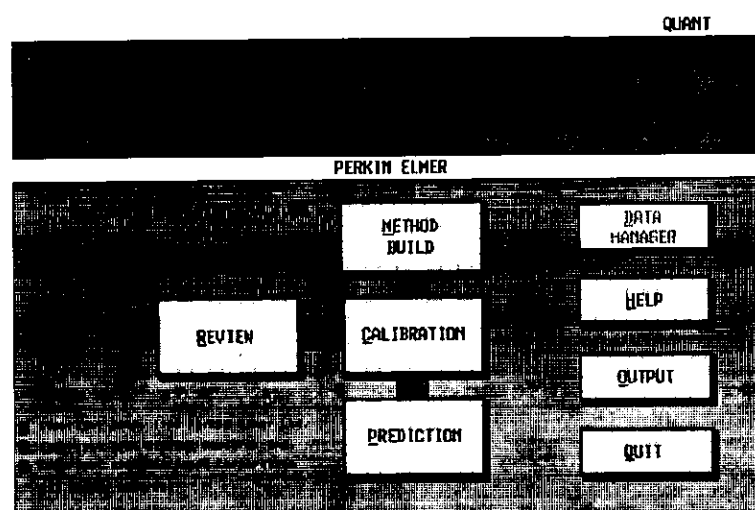


Figura 3.7: Pantalla principal

Las etapas en las que se divide el software son las siguientes:

- "METHOD BUILD". Construcción del método, utiliza los espectros de las muestras estándar.
- "CALIBRATION". Calibración utilizando diferentes tipos de algoritmos.
- "REVIEW". Revisión de la calibración.
- "PREDICTION". Análisis de muestras problema.

3. Se selecciona ["METHOD BUILD"], se abre la siguiente pantalla:

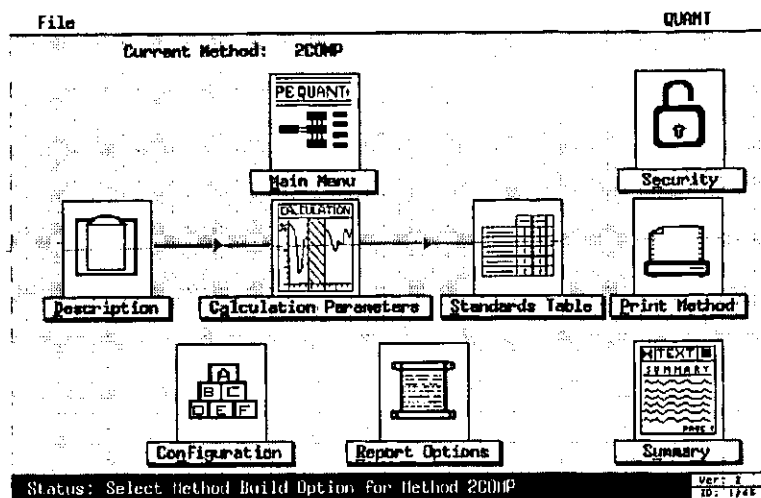


Figura 3.8: Construcción del método

Las etapas principales de construcción de método se presentan secuencialmente:

- a) Descripción del método. La ventana "Method Description" se abre automáticamente, se escribe el nombre del método, el nombre del analista y los comentarios del análisis.

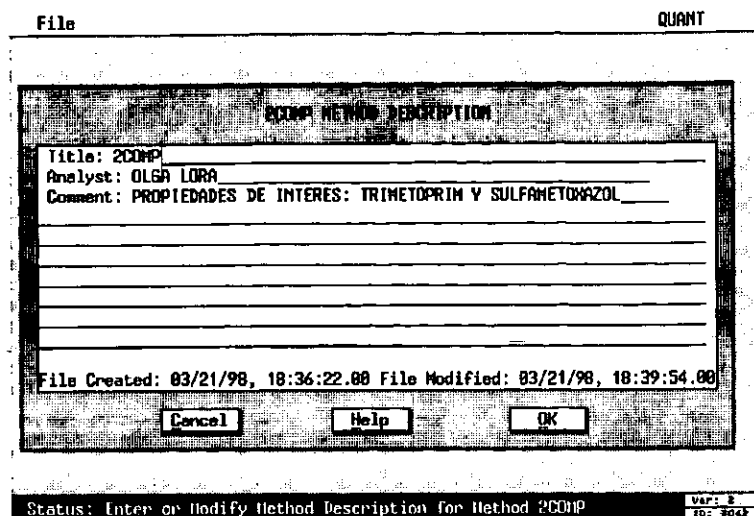


Figura 3.9: Descripción del método

- b) Configuración de datos. Seleccionar ["Configuration"] en la pantalla "METHOD BUILD", se abre la ventana "Configuration Parameters" y se seleccionan las siguientes opciones:

Parámetro	Opción
i. "Technique"	Infrarrojo
ii. "Format"	Manejo de datos
iii. "Algorithm"	PCR+
iv. "File Extension"	.SP

Tabla 3.5: Parámetros de configuración

- i. "Technique". Este parámetro permite seleccionar la técnica que se utilizara en el análisis. Al seleccionar la técnica, el programa asigna las unidades de número de onda contra absorción correspondiente a la región de seleccionada, en este caso, cm^{-1} contra absorbancia.
- ii. "Format". Con este parámetro se indica el tipo de formato en el que están almacenados los espectros.
- iii. "Algorithm". Este parámetro permite seleccionar el tipo de procedimiento matemático mediante el cual se realiza la descomposición espectral. El programa dispone de tres procedimientos matemáticos para ejecutar la descomposición espectral, que son: PCR+ Regresión de componentes

principales, PLS1 mínimos cuadrados parciales simples, PLS2 Mínimos cuadrados parciales complejos. Las diferencias entre los tres tipos son pequeñas, pero tienen efecto muy importante sobre los resultados.

- iv. "File Extension". Este parámetro indica la terminación del archivo en el cual se guardan los espectros.
- c) Selección de los parámetros de cálculo. Inmediatamente después, se abre la ventana "Calculation Parameters", en ésta ventana se introduce la siguiente información:

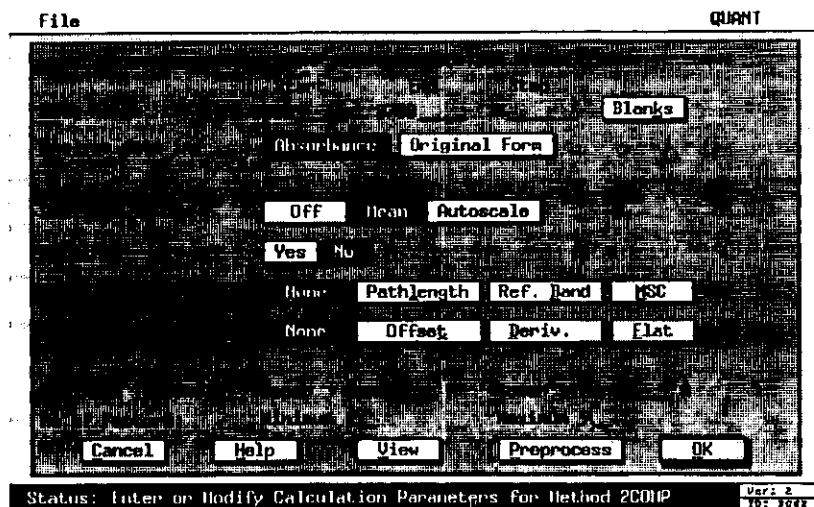


Figura 3.10: Parámetros de cálculo

- i. "Data Range". Este parámetro permite seleccionar el intervalo espectral que se utilizará en el análisis.
- ii. "Step". Este parámetro permite seleccionar el intervalo de muestreo, para la región espectral seleccionada, es decir, cada cuantos cm^{-1} el programa tomará una lectura. El intervalo seleccionado puede ser igual, múltiplo o submúltiplo de la resolución de los espectros.

- iii. "Blanks". Este parámetro eliminar todas aquellas regiones del espectro con excesiva absorbancia o regiones que no están relacionadas con la calibración, por ejemplo bandas de CO₂.
- iv. "Analyse data in". Este parámetro define la forma en que se analizan los espectros, "Absorbance" procesa los datos en absorbancia y "original form" procesa los datos tal como se almacenan.
- v. "Scaling". Este parámetro se ejecuta para dar mayor importancia a las bandas con mayor contenido de información. Se puede aplicar a los espectros, así como a los valores de las propiedades. Cuenta con tres opciones: la opción "Off" indica que no se aplica, la opción "Mean" calcula el espectro promedio de todos los espectros de calibración y subtrae éste de cada espectro, la opción "Autoscale" calcula el espectro desviación estándar y divide cada uno de los espectros de los estándares por éste.
- vi. "Smooth". Este parámetro permite suavizar el espectro cuando presenta ruido.
- vii. "Normalization". Este parámetro permite llevar un espectro a una escala de 0 a 100% de T con la finalidad de compensar diferencias de paso óptico o de reflexión. Cuenta con cuatro opciones: "Pathlength" la cual se utiliza para indicar un paso óptico fijo, "Ref. band" se utiliza cuando el paso óptico no es fijo y se ha adicionado un estándar interno la cual tiene bandas bien definidas que no se traslapan con la matriz, "MSC" Es útil en sistemas de longitud de paso óptico indeterminado, como son las mediciones realizadas por reflectancia difusa.
- viii. "Baseline correction". Este parámetro permite corregir la línea base de los espectros causadas por diferencias marcadas del tamaño de partícula. Cuenta con cuatro opciones: "Offset" esta opción calcula el promedio de intensidad para cada espectro y este promedio lo resta a cada una de las bandas del espectro. "Derivate" Esta opción se utiliza cuando los espectros de una muestra a otra presentan pocos cambios. "Flat" Establece una línea recta que pasa por la mayoría de las bases de las bandas principales.

- ix. "Orderate thresholds". Este parámetro permite especificar las regiones del espectro que serán eliminadas de la calibración, sobre la base de sus valores de ordenada. Por ejemplo, al colocar el límite superior de esta opción en 1.5 A se obliga a la calibración a ignorar regiones del espectro donde la intensidad es mayor a 1.5 A.
- x. "No. of factors". Este parámetro permite seleccionar el número mínimo y máximo de factores a ser utilizados por el modelo de calibración. Un factor es un "espectro" matemático representa una variación en los datos.

d) Construcción de la tabla de estándares. Se abre la ventana "Standards Table". Los nombres de los componentes se escriben en el renglón superior de la tabla y el nombre de las muestras en la columna izquierda. Las concentraciones de los componentes se introducen a la tabla, escribiendo el valor en el espacio apropiado. La tabla finalizada es la siguiente:

PROPERTIES STANDARDS	TRIME %	SULFA %
AA001	1.6500	97.3510
AA002	3.8079	93.8742
AA003	6.6225	86.9205
AA004	6.6225	90.3974
AA005	8.9510	79.9669
AA006	9.0397	76.7400
AA007	9.9338	75.8993
AA008	11.6821	69.5364
AA009	12.5166	68.1457
AA010	12.7947	65.3642
AA011	12.9980	83.4437
AA012	13.0400	67.6100
AA013	13.1200	67.8300
AA014	13.3500	68.1500
AA015	13.3510	59.1060
AA016	13.6291	72.7400

Validation Standards Method Info Help Cancel OK
 Status: No Validation Selected. Select Validation (R=Reject)

Tabla 3.6: Tabla de estándares

File Utilities Edit		QUANT			
PROPERTIES STANDARDS	TRIME %	SULFA %			
AA016	13.6291	72.7400			
AA017	13.8400	67.8100			
AA018	13.8489	68.3376			
AA019	13.9873	63.9735			
AA020	14.0300	67.6500			
AA021	14.1500	67.9800			
AA022	14.1854	66.7550			
AA023	14.2200	66.8700			
AA024	14.4900	66.2600			
AA025	14.6700	59.4537			
AA026	15.0199	72.3179			
AA027	15.2900	73.8411			
AA028	15.7285	78.3642			
AA029	15.9934	62.5828			
AA030	17.3841	78.9272			
AA031	17.9500	59.8814			

Validation Standards Method Info Help Cancel OK

Status: No Validation Selected. Select Validation (R=Reject) Ver: 4 10: 744

Tabla 3.7: Tabla de estándares

4. Seleccionar ["CALIBRATION"] del menú principal. Se despliega la siguiente pantalla:

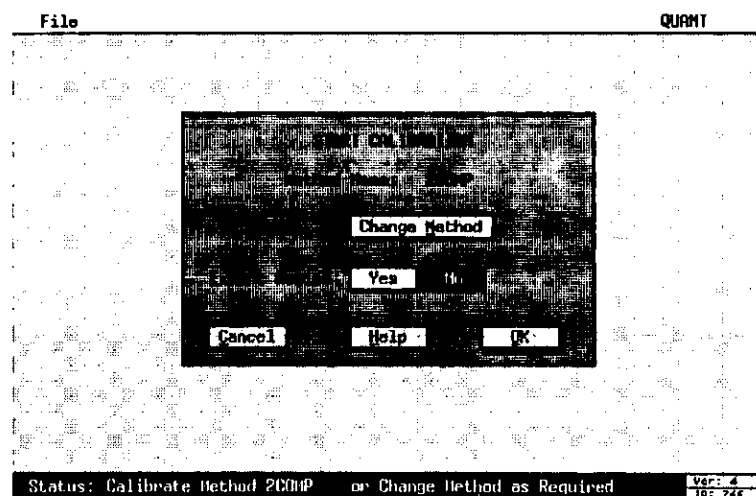


Figura 3.11: Inicio de la calibración

Se ejecuta la calibración. El proceso de calibración es central para Quant+. Durante la calibración, el "software" lee los datos, aplica los parámetros de calculo y construye un modelo de calibración entre los espectros y los valores de las propiedades de interés. Al concluir la calibración, se presenta un breve resumen de los resultados.

Propiedad	No. Factors ⁱ	% Variance ⁱⁱ	S. E. E. ⁱⁱⁱ	S. E. P. ^{iv}
TRIMETOPRIM	8	99.69	0.2300	0.2607
SULFAMETOXAZOL	7	99.82	0.4509	0.5176

Tabla 3.8: Resumen de resultados de calibración

Con este resumen se puede evaluar que tan bien la calibración se ajusta a los datos, y que tan bien la calibración puede predecir muestras problema.

- i. "No. factors". Es el número de "espectros" matemáticos utilizados por el modelo de calibración. Es importante desarrollar un modelo que este formado por un numero adecuado de factores para modelar apropiadamente los componentes de interés sin adicionar ruido.
- ii. "% Variance". El porcentaje de varianza, frecuentemente, se reporta $R^2 \times 100$ y este resultado se interpreta como un porcentaje de las variaciones, presentes en los datos, que explica el modelo matemático propuesto. R^2 , es el coeficiente de correlación múltiple, se expresa como una fracción de 1.0.
- iii. Error estándar de estimación (S.E.E., por sus siglas en ingles). Es la desviación estándar de los residuales para muestras dentro de la curva de calibración. El residual para cada muestra es la diferencias entre los valores de propiedad especificados y los valores de propiedad estimados. La estadística S.E.E. es una estimación de la "mejor" exactitud que se puede obtener para el modelo matemático generado.

iv. El error estándar de predicción (S.E.P., por sus siglas en inglés). Es la desviación estándar de los residuales para muestras que se encuentran fuera de la curva de calibración. El residual para cada muestra es la diferencia entre los valores de propiedad especificados y los valores de propiedad estimados de dichas muestras.

5. Revisión y optimización de la calibración.

Una vez que se ha concluido el proceso de calibración, es importante identificar el conjunto de parámetros que generan un modelo matemático óptimo, los pasos a seguir son los siguientes:

a) Se realiza un análisis del resumen de resultados de la calibración, que se presenta en la Tabla 3.8: Resumen de resultados de calibración.

b) Se realiza un análisis de las gráficas que se presentan en el módulo revisión, este grupo de gráficas permiten analizar e interpretar los datos siguiendo los puntos que se indican a continuación:

- ¿ El número de factores utilizados son los adecuados para el modelo ?
- ¿ La curva de calibración contiene algún espectro con características diferentes a la mayoría de los espectros ?
- ¿ El modelo de calibración contiene valores de concentraciones muy diferentes de la mayoría de los datos?
- ¿ El modelo de regresión se encuentra influenciado por uno o más estándares ?

Los pasos a) y b) se realizan para conocer la calidad del modelo desarrollado.

c) Se selecciona el conjunto de parámetros que generan un "buen" modelo matemático, la selección consiste en modificar en forma ordenada los

parámetros de la Tabla 3.10: Parámetros de cálculo, de la siguiente forma:

- Se modifica el valor de un parámetro, se ejecuta la calibración, y se repiten los pasos a) y b).
- El parámetro modificado se regresa a su valor inicial y se modifica otro parámetro, nuevamente se realiza la calibración, y se repiten los pasos 1 y 2. Este proceso se realiza sucesivamente hasta obtener los mejores resultados o hasta que no se presenten cambios de importancia.

Optimizar la calibración tanto como sea posible garantiza buenos resultados de predicción en las muestras problema. En la optimización del método se modificaron los siguientes parámetros:

Parámetro	Valor	Propiedad	% Variance	S.E.E.	S.E.P.
Resultados obtenidos en la primera calibración		Trimetoprim Sulfametoxazol	99.69 99.82	0.2300 0.4509	0.2607 0.5176
Suavización	19	Trimetoprim Sulfametoxazol	99.77 99.82	0.1982 0.4590	0.2273 0.5268
Normalización	Pathlength	Trimetoprim Sulfametoxazol	99.79 99.82	0.1964 0.4675	0.2315 0.5277
Normalización	MSC	Trimetoprim Sulfametoxazol	99.79 99.82	0.1964 0.4675	0.2315 0.5277
Corrección de línea base	Offset	Trimetoprim Sulfametoxazol	99.80 99.82	0.1953 0.4509	0.2300 0.5176
Corrección de línea base	Flat	Trimetoprim Sulfametoxazol	99.72 99.82	0.2242 0.5620	0.2628 0.6404

Tabla 3.9: Optimización del método

Al modificar los diferentes parámetros se presentan pequeños cambios con respecto a los valores obtenidos en la primera calibración. El parámetro *Corrección de línea base* con opción *Offset*, presenta el % de varianza más alto y los errores más pequeños, para las dos propiedades. De esta forma, el conjunto de parámetros al terminar la optimización es el siguiente:

Parámetro	Opción
i. "Data Range"	6500-3700 cm ⁻¹
ii. "Step"	4 cm ⁻¹
iii. "Blanks"	No se aplicó
iv. "Analyse data in"	"Absorbance"
v. "Scaling"	"Mean"
vi. "Smooth"	"No"
vii. "Normalization"	"None"
viii. "Baseline correction"	"Offset"
ix. "Ordinate threshold "	"None"
x. "No. of. factors"	mínimo 2 máximo 9

Tabla 3.10: Parámetros de cálculo

6. Selección del algoritmo. El paso siguiente es seleccionar el algoritmo de trabajo que mejor ajuste a los datos y parámetros ya establecidos. Los resultados de los tres algoritmos de cuantificación con los que cuenta el "software" Quant +, se presentan a continuación.

Tipo de algoritmo	Propiedad	% Variance	S.E.E.	S.E.P.
PCR+ Algoritmo con el que se inicia el análisis	Trimetoprim	99.79	0.1964	0.2315
	Sulfametoxazol	99.82	0.4675	0.5277
PLS2	Trimetoprim	99.83	0.1766	0.1973
	Sulfametoxazol	99.99	0.1319	0.1624
PLS1	Trimetoprim	99.98	0.0668	0.1990
	Sulfametoxazol	99.99	0.1306	0.1624

Tabla 3.11: Selección del algoritmo

El algoritmo con el que se inicio el análisis fue PCR+, al aplicar el algoritmo PLS2 aumenta los valores de % de varianza y disminuyen los valores de los errores, para cada propiedad. Al aplicar el algoritmo PLS1, el valor de % de varianza para la propiedad Trimetoprim aumentó y los valores de los errores son los más pequeños. Tenemos que el algoritmo PLS1 es el que proporciona los mejores resultados.

7. Validación. Una vez que se obtienen los mejores resultados de calibración es importante determinar si es confiable para cuantificar las propiedades de las muestras problema, utilizando únicamente sus espectros.

Esta comprobación se realiza sometiendo la calibración a un proceso conocido como validación. El proceso de validación se realiza utilizando un conjunto independiente de muestras cuyos valores de concentración se conocen, una opción alternativa cuando no se dispone de este conjunto de muestras es utilizar la validación "full cross". Al seleccionar la validación "full-cross" cada muestra se elimina de la calibración y se analiza como una muestra problema en una curva de calibración formada con los estándares sobrantes. La siguiente tabla muestra los resultados de calibración sin validación y con validación.

SIN VALIDACIÓN				
Algoritmo	Propiedad	% Variance	S.E.E.	S.E.P.
PLS1	Trimetoprim	99.98	0.0668	0.1990
	Sulfametoxazol	99.99	0.1306	0.1521
CON VALIDACIÓN FULL CROSS				
Algoritmo	Propiedad	% Variance	S.E.E.	S.E.P.
PLS1	Trimetoprim	99.84	0.1652	0.2158
	Sulfametoxazol	99.99	0.1306	0.2965

Tabla 3.12: Validación de la curva de calibración

El modelo de calibración con validación proporciona un modelo óptimo para analizar muestras problema.

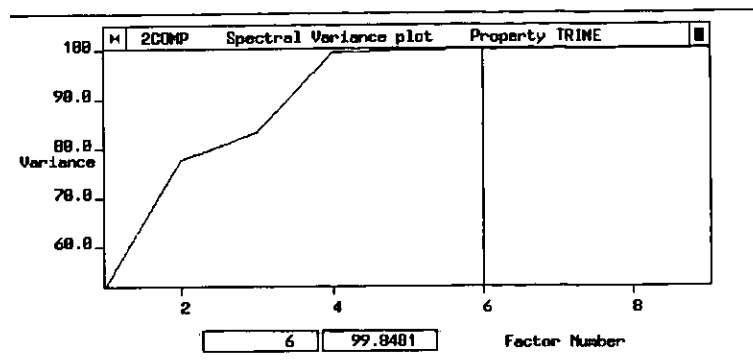
8. Revisión del modelo de calibración final

Las gráficas del modelo de calibración final son las siguientes:

a) ¿ El número de factores utilizados son los adecuados para el modelo?

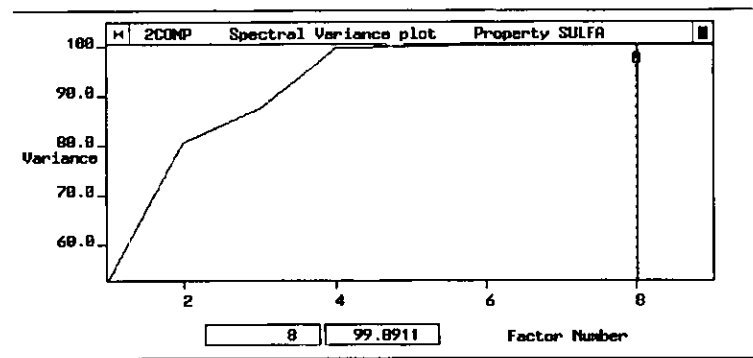
Es muy importante identificar el número correcto de factores, es decir, las fuentes de variación en los datos. Debido a que utilizar más factores de los necesarios introducen ruido al modelo y al utilizar pocos factores elimina información química importante para la propiedad. La identificación del número correcto de factores se hace mediante las gráficas Variación Espectral y Error Estándar de Predicción.

En la gráfica Variación Espectral se representa el porcentaje de variación espectral contra el número de factores. En esta gráfica aparece una línea de corte seleccionada por el programa QUANT+, que indica el número de factores necesarios para describir adecuadamente las variaciones en las concentraciones y en los espectros, todos los factores que se encuentran a la derecha de la línea de corte contribuyen únicamente con ruido.



Para la propiedad Trimetoprim son 6 factores los que describen el 99.84% de las variaciones presentes en los espectros y en las concentraciones relacionadas a esta propiedad

Figura 3.12: Gráfica de variación espectral para Trimetoprim



Para la propiedad Sulfametoxazol son 8 factores los que describen el 98.89% de las variaciones presentes en los espectros y en las concentraciones relacionadas con esta propiedad

Figura 3.13: Gráfica de variación espectral para Sulfametoxazol

La gráfica complementaria para establecer el número de factores es la gráfica Error Estándar de Predicción (SEP), en esta gráfica se representa el error estándar de predicción contra el número de factores y proporciona el número de factores útiles para el modelo. En las dos gráficas siguientes, el error de predicción disminuye con cada nuevo factor que se adiciona, es

decir, hasta antes de llegar al punto mínimo de la gráfica el número de factores no es suficiente para modelar los componentes de interés, esto se conoce como bajo ajuste. En algún punto, la gráfica SEP alcanza un mínimo e inicia su ascenso, a partir de este punto, el modelo empieza a adicionar factores que únicamente contienen ruido, incluir vectores de ruido en el modelo se conoce como sobre ajuste. De acuerdo al programa QUANT+, el número de factores en donde la gráfica SEP alcanza un mínimo, es la mejor elección para el modelo.

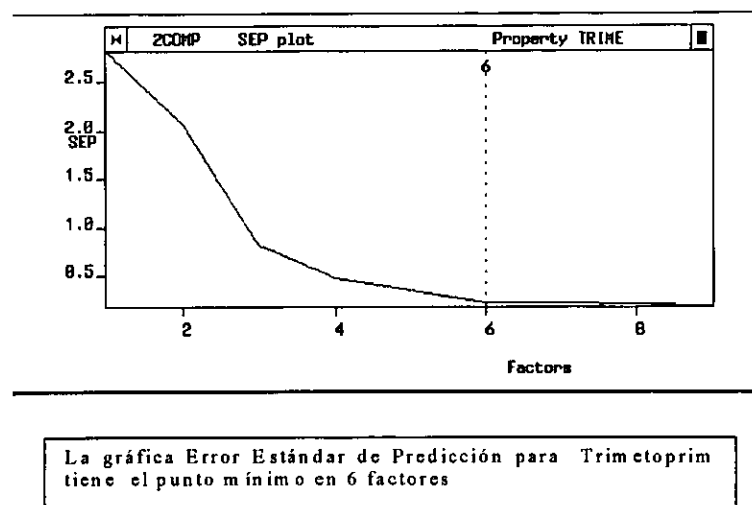


Figura 3.14: Gráfica error estándar de predicción para Trimetoprim

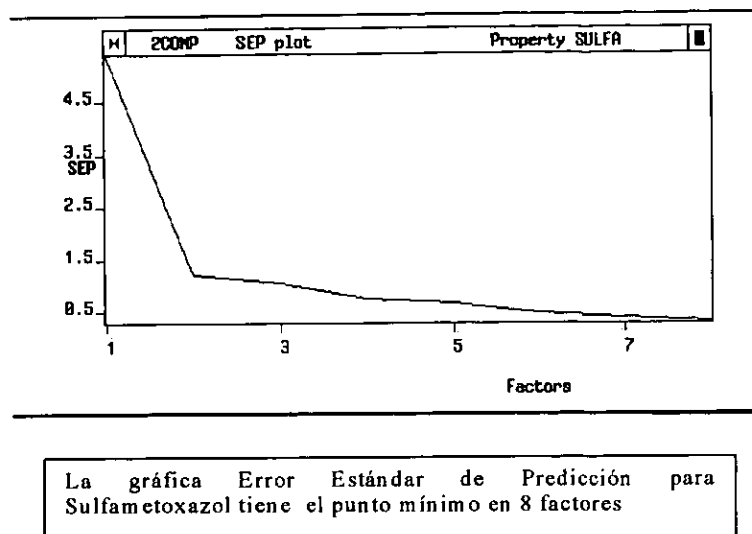


Figura 3.15: Gráfica de error estándar de predicción para Sulfametoxazol

De las gráficas, Varianza Espectral y Error Estándar de Estimación se establece que el número de factores para Trimetoprim es de 6 y para Sulfametoxazol es de 8.

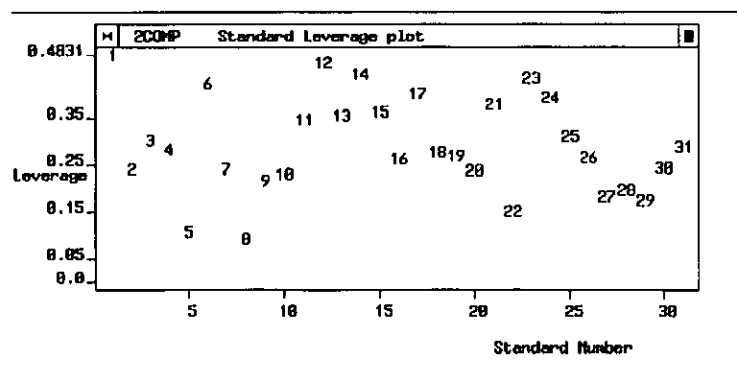
b) ¿ La curva de calibración contiene algún espectro con características diferentes a la mayoría de los espectros ?

Un espectro fuera se define como un estándar en donde el espectro tiene características diferentes a la mayoría de los espectros de las muestras del set de calibración. Es un estándar cuyo espectro se midió inadecuadamente por cambios en la ejecución del instrumento, malos procedimientos de muestreo o tiene impurezas no presentes en el resto de las muestras.

La gráfica Espectros Fuera, refleja la importancia de cada muestra estándar en la curva de calibración para el calculo de los factores. Es decir, indica, como influye cada estándar sobre la calibración y permite detectar aquellos espectros que se encuentran fuera de la misma.

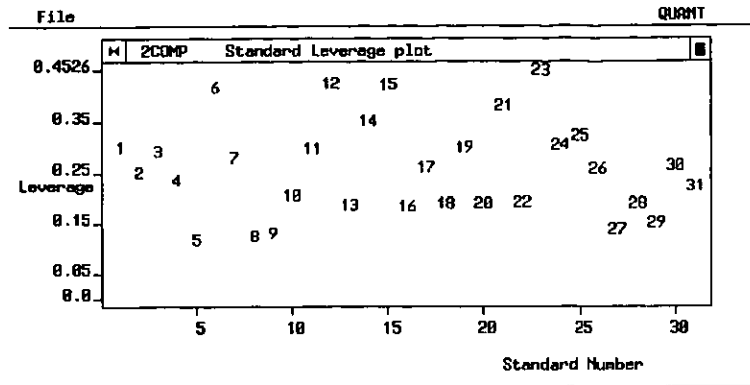
En esta gráfica, los valores del eje y deben encontrarse entre 0 y 1 de acuerdo al programa QUANT+, cualquier estándar arriba de 0.9 se considera como un posible espectro fuera. Una vez que se detectan los espectros fuera, se debe investigar el origen de los errores. Hay dos casos frecuentes:

- Los espectros de ciertos estándares pueden estar fuera de la calibración debido a que presentan ruido excesivo. En estos casos, se debe eliminar la región ruidosa del espectro por introducción de una región blanco, cambiar el rango de análisis o eliminar los estándares de la calibración.
- No todos los espectros fuera son irregulares, algunos estándares que se encuentran en los extremos del intervalo de concentración a veces aparecen como espectros fuera. En este caso, es necesario adicionar estándares de una naturaleza similar para minimizar la influencia de dichos estándares sobre la calibración.



La curva de calibración de Trimetoprim, no contiene espectros fuera

Figura 3.16: Gráfica espectros fuera para Trimetoprim



La curva de calibración para Sulfametoxazol, no contiene espectros fuera

Figura 3.17: Gráfica espectros fuera para Sulfametoxazol

c) ¿ El modelo de calibración contiene valores de concentraciones muy diferentes de la mayoría de los datos?

Es importante identificar aquellos estándares cuyos valores de concentración son inconsistentes con la mayoría de los datos. La gráfica de Concentraciones Fuera se divide en cuatro áreas por dos líneas de corte vertical así, de acuerdo al programa QUANT+:

- Estándares que aparecen en el recuadro inferior izquierdo tienen espectros y concentraciones que ajustan bien uno con otro.
- Estándares en el recuadro superior izquierdo tienen espectros que ajustan bien uno con otro pero con concentraciones sospechosas.
- Estándares en el recuadro inferior derecho tienen valores de concentración adecuados pero sus espectros son irregulares.
- Finalmente estándares en el recuadro superior izquierdo tienen espectros y valores de propiedad son irregulares.

Estas frecuencias de corte no se consideran absolutas, pero si un estándar no ajusta con el modelo, dicho estándar se debe investigar.

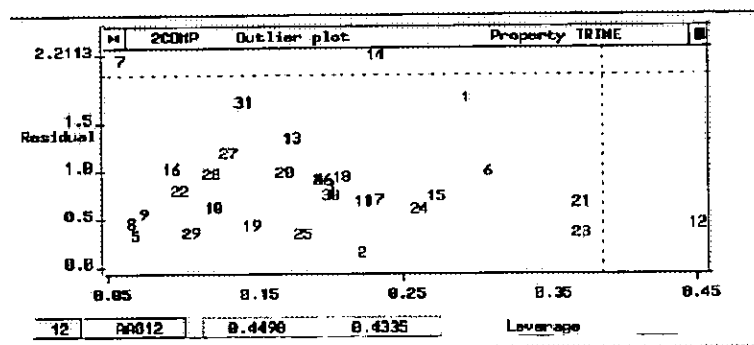
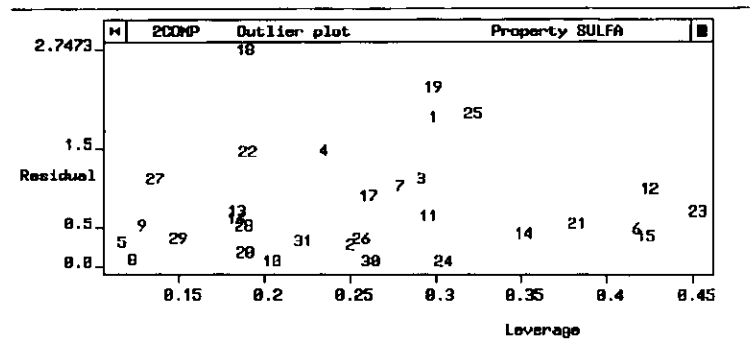


Figura 3.18: Gráfica concentraciones fuera para Trimetoprim

En esta gráfica, el estándar AA012, aparece en el recuadro inferior derecho, lo que indica que tiene un valor adecuado para la propiedad pero que su espectro es irregular. Frecuentemente, algunos estándares aparecen en el recuadro inferior derecho de esta gráfica porque sus valores de concentración se encuentran en el extremo del rango de calibración, es decir, muestras que contienen la concentración más alta o más baja de un componente. Este es el caso del estándar AA012, el cual se sitúa en el extremo superior de la curva de calibración en la gráfica Estimado contra Especificado. Es decir, no es una muestra fuera, sólo indica que es necesario introducir más estándares con concentraciones similares en la curva de calibración.



Ningún estándar de la propiedad Sulfametoxazol presenta concentraciones sospechosas o irregulares, es por eso que no se despliegan las frecuencias de corte

Figura 3.19: Gráfica concentraciones fuera para Sulfametoxazol

d) ¿ El modelo de regresión se encuentra influenciado por uno o más estándares ?

El modelo de regresión no debe estar influenciado por uno o dos estándares, la gráfica Influencia de Estándar permite identificar a este tipo estándares. Esta gráfica se divide en 4 áreas por dos líneas corte en ambos ejes. La línea de corte vertical corresponde a un 10% de probabilidad de que el valor de propiedad de un estándar no ajuste con el resto del modelo. La línea de corte horizontal, si es que se presenta, corresponde a un 10% de probabilidad de que la ecuación de regresión cambie significativamente cuando un estándar se omite del modelo de regresión así, de acuerdo al programa:

- Estándares en el recuadro inferior izquierdo no dominan la regresión.
- Estándares en el recuadro superior izquierdo dominan la regresión pero tienen espectros que ajustan bien con los estándares.
- Estándares en el recuadro inferior derecho no dominan la regresión pero tienen espectros irregulares.
- Estándares en el recuadro superior derecho dominan la regresión y tienen espectros irregulares.

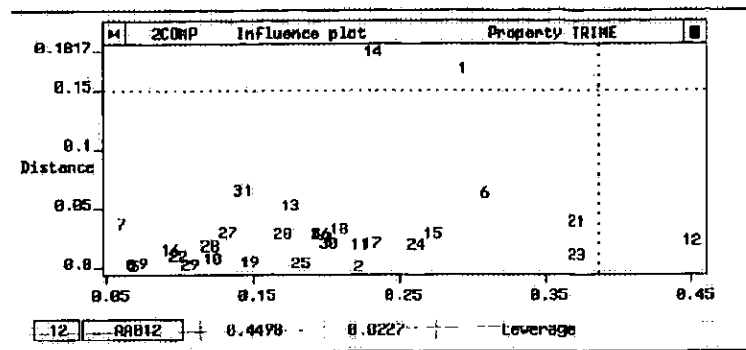
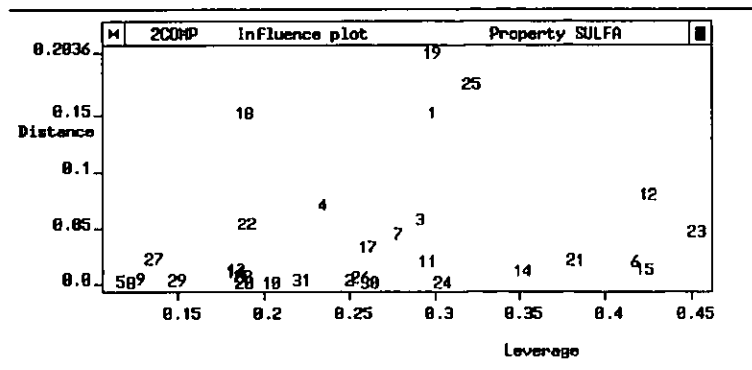


Figura 3.20: Gráfica influencia de estándar para Trimetoprim

Nuevamente, el estándar AA012 para la propiedad Trimetoprim se encuentra en el recuadro inferior derecho, lo que indica que no dominan la regresión pero su espectro es irregular. Esto parece indicar que influye sobre la regresión, pero debe notarse que dicho estándar está en el extremo inferior del rango de calibración (gráfica Estimado contra Especificado) para esta propiedad, nuevamente, los estándares en el extremo de un rango de calibración frecuentemente aparecen en el recuadro inferior derecho, si no hay otro estándar de naturaleza similar en el set de calibración. Por lo anterior, el estándar AA012 no se rechaza, ni se descarta en la tabla de estándares.



Ningún estándar de la propiedad Sulfametoxazol presenta irregularidades, por esto no se despliegan las frecuencias de corte

Figura 3.21: Gráfica influencia de estándar para Sulfametoxazol

9. Análisis de muestras problema. Una vez construida y optimizada la calibración. Se realiza la cuantificación de las propiedades de las muestra problema.
 - a) Se guardan los espectros de las muestras problema en el disco duro.
 - b) Se selecciona ["PREDICCIÓN"] del menú principal, se despliega la siguiente pantalla:

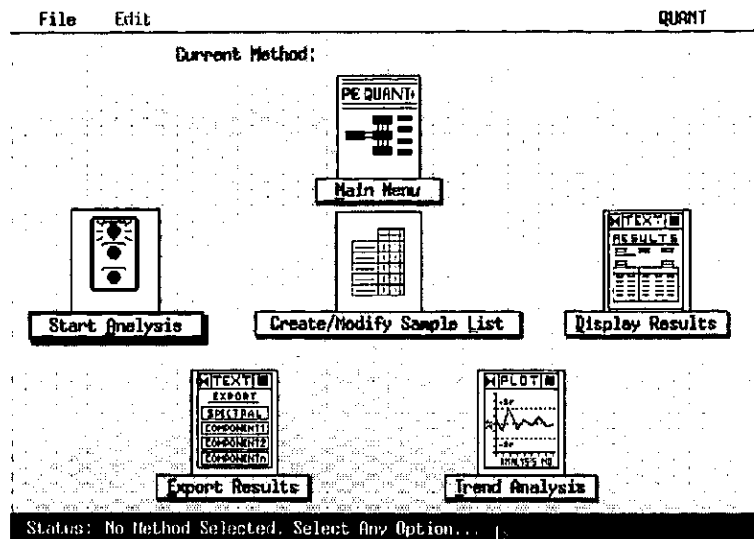


Figura 3.22: Menú predicción

- c) Para iniciar el análisis, se selecciona ["Start Analysis"].
- d) Cuando el proceso de cuantificación termina los resultados se muestran en un listado.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1. RESULTADOS DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

Se ha descrito y analizado la construcción de un método analítico para la cuantificación de Trimetoprim y Sulfametoxazol. Durante el desarrollo de este método analítico se estudiaron los parámetros instrumentales, el diseño de la curva de calibración y los parámetros del método quimiométrico, para obtener óptimos resultados.

A continuación se presentan los resultados del método analítico, distribuidos en cuatro secciones: parámetros espectrales y accesorio, parámetros utilizados en el método quimiométrico, resultados de calibración, resultados de predicción para las muestras problema.

4.1.1 Parámetros espectrales y accesorio

Parámetro	Valor seleccionado
Región espectral	Infrarrojo cercano (6500 - 3700 cm^{-1})
Resolución	4 cm^{-1}
Número de Barridos	5
Accesorio	Esfera de integración

Tabla 4.1: Resumen de los parámetros espectrales y accesorio

Los espectros de las muestras estándar y muestras problema se analizaron en el intervalo de 6500-3700 cm^{-1} en una resolución de 4 cm^{-1} y 5 barridos, utilizando como accesorio de muestreo la esfera de integración.

4.1.2 Parámetros utilizados en el método quimiométrico

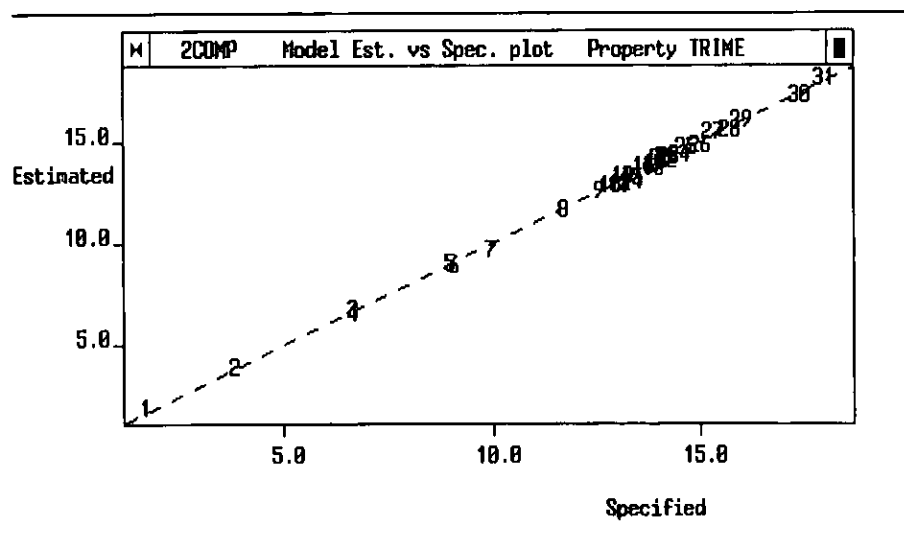
Parámetro	Valor seleccionado
Número de propiedades	2
Número de estándares	31
Escalamiento	Medio
Corrección de línea base	"offset"
Número de factores para Trimetoprim	6
Número de factores para Sulfametoxazol	8
Algoritmo	PLS1
Validación	"Full Cross"

Tabla 4.2 Resumen de los parámetros utilizados en el método quimiométrico

El método cuantifica 2 propiedades. La curva de calibración esta formada por 31 estándares. Se utilizó escalamiento medio para dar más importancia a las bandas con mayor contenido de información y corrección de línea base "offset", este parámetro tiene como beneficio compensar la línea base cuando se distorsiona por el tamaño de partícula. Los espectros se correlacionaron con sus respectivas concentraciones mediante el algoritmo PLS1. El número de factores utilizados para reconstruir los espectros fue de 6 para Trimetoprim y de 8 para Sulfametoxazol. La validación "Full Cross" permitió determinar la confiabilidad del modelo de calibración, para cuantificar las propiedades de las muestras problema.

4.2 RESULTADOS DE CALIBRACIÓN

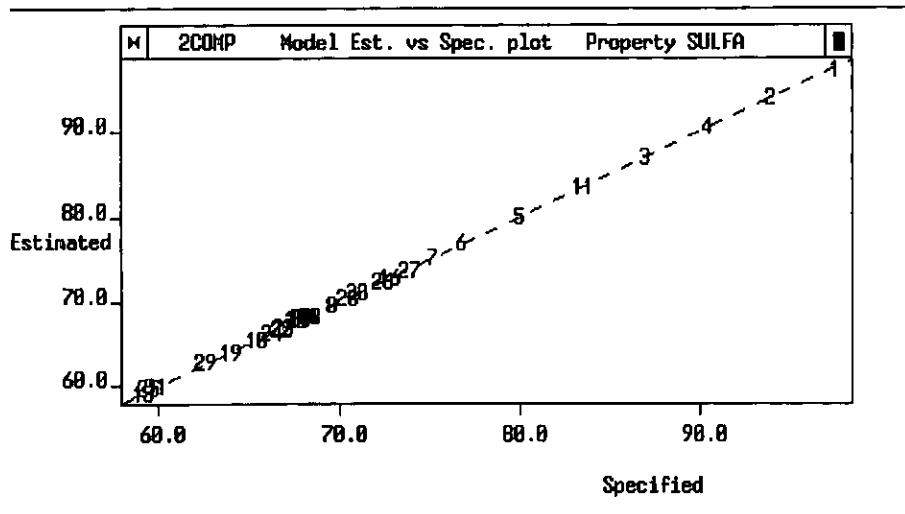
Las figuras 4.1 y 4.2 muestran los resultados de calibración para la propiedad Trimetoprim y para la propiedad Sulfametoxazol, respectivamente. En la gráfica Estimado contra Especificado para cada propiedad la coordenada-x representa los valores introducidos a la tabla de estándares cuando se construye el método y la coordenada-y representa los valores que calcula el modelo, para cada estándar. Estas gráficas permiten observar la distribución de los estándares, sobre la curva de calibración para cada propiedad.



Curva de calibración para la propiedad Trimetoprim

Intervalo de concentración	= 1.6500 - 17.9500 %
Correlación Múltiple (R).	= 0.9992
% de varianza ($R^2 \times 100$).	= 99.8415 %
Error Estándar de Estimación (S.E.E.) . . .	= 0.1652
Error Estándar de Predicción (S.E.P.) . . .	= 0.2158

Figura 4.1: Resultados de calibración para la propiedad Trimetoprim



Curva de calibración para la propiedad Sulfametoxazol

Intervalo de concentración	= 59.1016 - 97.3510 %
Correlación Múltiple	= 0.9999
% de varianza ($R^2 \times 100$)	= 99.9866 %
Error Estándar de Estimación (S.E.E.) . . .	= 0.1306
Error Estándar de Predicción (S.E.P.) . . .	= 0.2965

Figura 4.2: Resultados de calibración para Sulfametoxazol

Los programas de regresión múltiple calculan una serie de estadísticas mediante las cuales es posible decidir que tan bien la calibración ajusta a los datos y que tan bien la calibración puede predecir muestras problema.

El intervalo de concentraciones seleccionado para Trimetoprim fue de 1.6500 - 17.9500 % en peso y para Sulfametoxazol de 59.1016 - 97.3510 % en peso.

El coeficiente de correlación (R) para la propiedad Trimetoprim es de 0.9992 y para la propiedad Sulfametoxazol es de 0.9999, un coeficiente de correlación ideal debe ser cercano a 1.00. Los valores de R para este análisis indican que hay un buen ajuste de los datos a la curva de calibración.

"% Variance". El porcentaje de varianza, frecuentemente, se reporta como $R^2 \times 100$ y este resultado se interpreta como el porcentaje de las variaciones, presentes en los datos, que explica el modelo matemático propuesto.

El coeficiente de determinación múltiple (R^2), se expresa como una fracción de 1.0. Sí, $R^2 = 1.00$ indica que la ecuación de calibración explica el 100% de las variaciones presentes en los datos. Un $R^2 = 0.50$ indica que el 50% de las variaciones presentes en los datos son explicadas por la ecuación de calibración (modelo matemático) y 50% no es explicado.

Cuando se desarrolla una calibración lo más adecuado es tener valores de R^2 cercanos 1.0. El coeficiente de determinación múltiple para la propiedad Trimetoprim es 0.998415 y para la propiedad Sulfametoxazol es de 0.99986.

Cuanto más cercano sea al 100 % el "% Variance" mejor será la capacidad del modelo de regresión múltiple para predecir las muestras problema. Para la propiedad Trimetoprim, el 99.8415 % de las variaciones presentes en los

datos, han sido explicadas, y para la propiedad Sulfametoxazol el 99.9866 % de las variaciones presentes en los datos, han sido explicadas por el modelo de regresión propuesto.

El modelo de regresión múltiple presenta dos tipos de errores para cada propiedad: Error Estándar de Estimación (S.E.E.) y Error Estándar de Predicción (S.E.P.). Ambos errores, son distancias relativas que existen entre el valor ajustado y el valor observado, lo ideal es que ambos errores sean cercanos a cero.

Error estándar de estimación (S.E.E.). Es la desviación estándar de los residuales para muestras dentro de la curva de calibración. El residual para cada muestra es la diferencia entre los valores de propiedad especificados y los valores de propiedad estimados. La estadística S.E.E. es una estimación de la "mejor" exactitud que se puede obtener para el modelo matemático generado. El Error Estándar de Estimación para Trimetoprim es de 0.1652 % y para Sulfametoxazol es de 0.1306%.

El error estándar de predicción (S.E.P.). Es la desviación estándar de los residuales para muestras que se encuentran fuera de la curva de calibración. El residual para cada muestra es la diferencia entre los valores de propiedad especificados y los valores de propiedad estimados de dichas muestras. El Error Estándar de Predicción para Trimetoprim es de 0.2158 % y para Sulfametoxazol es de 0.2965 %.

En la siguiente gráfica se muestran los errores asociados al modelo, la línea de 45 grados representa una calibración ideal. El error en la dirección-Y, es el Error Estándar de Estimación ((S.E.E.), el error en la dirección-X es el Error Estándar de Predicción (S.E.P.).

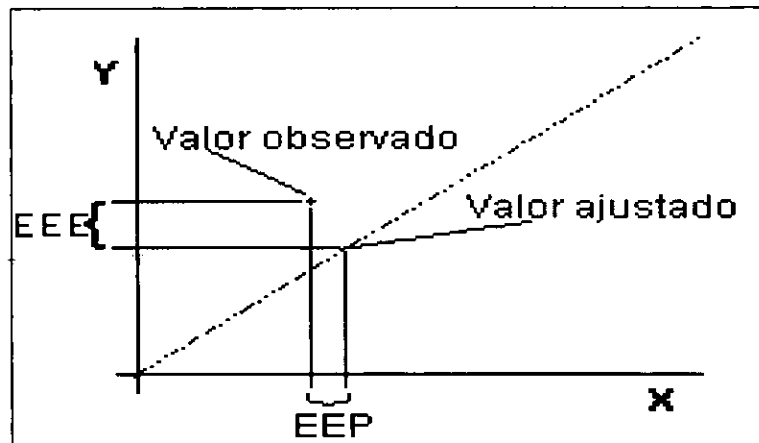


Figura 4.3: Errores del modelo de calibración

Una calibración debe predecir bien las muestras problema; un buen modelo debe describir adecuadamente las variaciones de cada propiedad (R^2) en los estándares de calibración y debe tener un pequeño error de predicción.

4.3 RESULTADOS DE PREDICCIÓN PARA LAS MUESTRAS PROBLEMA

Se hizo la predicción de tres muestras problema, cada una de las muestras se analizó por triplicado. Los resultados se presentan en la tabla 4.3. En la primer columna se indica el número de problema y los promedios para cada columna, en la segunda y quinta columna se indican las concentraciones obtenidas directamente de "software" Quant+, estas concentraciones se expresan en porcentaje, es decir, en mg/100 mg, de la misma forma en que se construyó la curva de calibración. En la tercera y sexta columna se indican las concentraciones en mg/tab, considerando que la tableta tiene un peso promedio de 605 mg, según las especificaciones de laboratorios Carnot. En la cuarta y séptima columna se indica la concentración en %/tableta,

considerando que cada tableta tiene 80 mg de trimetoprim y 400 mg de sulfametoxazol, según las especificaciones de laboratorios Carnot.

En la tabla 4.4 se indican las concentraciones promedio para cada una de las tres muestras problema, en mg/tab y en %/tableta. Se realizó una corrección a la concentración, debido al peso promedio real de las tabletas. La corrección es la siguiente:

$$\text{Concentración corregida} = \frac{\text{Concentración promedio} * \text{Peso especificado de la tab.}}{\text{Peso promedio real de la tab.}}$$

Peso especificado de la tableta: Peso especificado en el marbete.

Peso promedio real de la tableta: Peso promedio de 20 tabletas.

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos nos indica que las tabletas de trimetoprim y sulfametoxazol deben contener no menos del 93.0 % y no más de 107.0 % de las cantidades de trimetoprim y sulfametoxazol indicadas en las especificaciones. En la séptima columna de la tabla 4.4, se indica la concentración corregida para las tres muestras en %/tableta, todas las concentraciones se encuentran en el intervalo establecido.

La tabla 4.5 muestra los resultados finales obtenidos por el método QUANT+, los resultados obtenidos por el método de referencia (HPLC), obtenidos de los certificados de calidad proporcionados por laboratorios Carnot para cada una de las muestra problema y la diferencia entre las dos concentraciones. Los resultados obtenidos tienen la siguiente características: los valores de concentración están muy próximos a los valores de concentración obtenidos por el método de referencia, la diferencia entre los dos valores es menor a 1.5 %, excepto para el problema número 3 de sulfametoxazol, que es ligeramente mayor. En términos generales, se puede decir que los resultados obtenidos el método Quant+ tienen concordancia con el método de referencia.

Número de problema	TRIMETOPRIM			SULFAMETOXAZOL		
	% (mg/100mg)	mg/tab	% / tableta	% (mg/100mg)	mg/tab	% / tableta
1A	14.27	86.3335	107.9169	66.94	404.9870	101.2468
1B	14.18	85.7890	107.2363	67.67	409.4035	102.3509
1C	14.24	86.1520	107.6900	67.84	410.4320	102.6080
Promedio	14.23	86.0915	107.6144	67.48	408.2742	102.0686
2A	13.32	80.5860	100.7325	67.91	410.8555	102.7139
2B	12.99	78.5895	98.2369	67.71	409.6455	102.4114
2C	13.05	78.9525	98.6906	68.10	412.0050	103.0013
Promedio	13.12	79.3760	99.2200	67.91	410.8353	102.7089
3A	13.94	84.3373	105.4213	67.91	410.8555	102.7139
3B	14.40	87.1200	108.9000	66.27	400.9335	100.2334
3C	13.71	82.9455	103.6819	68.05	411.7025	102.9256
Promedio	14.02	84.8018	106.0032	67.41	407.8305	101.9576

Tabla 4.3: Resultados del análisis de tres muestras problema

TRIMETROPRIM						
Número de Problema	Concentración promedio mg/tab	Concentración promedio %/tableta	Peso promedio real de la tableta mg	Peso especificado de la tableta mg	Concentración corregida mg/tab	Concentración corregida %/tableta
1	86.0915	107.6144	609.74	605	85.4222	106.7778
2	79.3760	99.2200	602.88	605	79.6551	99.5689
3	84.8018	106.0032	605.47	605	84.7359	105.9209
SULFAMETOXAZOL						
Número de Problema	Concentración promedio mg/tab	Concentración promedio %/tableta	Peso promedio real de la tableta mg	Peso promedio especificado de la tableta mg	Concentración corregida mg/tab	Concentración corregida %/tableta
1	408.2742	102.0686	609.74	605	405.1004	101.2751
2	410.8353	102.7089	602.88	605	412.2799	103.0701
3	407.8305	101.9576	605.47	605	407.5139	101.8785

Tabla 4.4: Resultados de predicción aplicando factor de corrección

TRIMETOPRIM					
Número de Problema	Concentración obtenida por el método Quant+ mg/tab	Concentración obtenida por el método Quant+ %/ tableta	Concentración obtenida por el método de referencia mg/tab	Concentración obtenida por el método de referencia %/ tableta	Diferencia
1	85.4222	106.7778	84.98	106.22	% 0.5578 mg 0.4422
2	79.6551	99.5689	80.53	100.66	% 1.0911 mg 0.8749
3	84.7359	105.9209	83.85	104.81	% 1.11 mg 0.8859
SULFAMETOXAZOL					
Número de Problema	Concentración obtenida por el método Quant+ mg/tab	Concentración obtenida por el método Quant+ %/ tableta	Concentración obtenida por el método de referencia mg/tab	Concentración obtenida por el método de referencia %/ tableta	Diferencia
1	405.1004	101.2751	406.02	101.50	% 0.2249 mg 0.9196
2	412.2799	103.0701	406.88	101.72	% 1.3501 mg 5.3999
3	407.5139	101.8785	413.76	103.44	% 1.5615 mg 6.2461

Tabla 4.5: Resultados finales obtenidos por el método Quant+ y por el método de referencia

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

La espectroscopia de infrarrojo cercano fue de gran utilidad en el desarrollo de este trabajo debido a que en esta región las bandas presentan pequeños coeficientes de absorción en muestras concentradas, esta característica permitió realizar el análisis sin necesidad de diluir la muestra en pastillas de KBr o emulsiones de nujol. Adicionalmente, en la región infrarrojo cercano se establecieron con mayor facilidad las diferencias entre los componentes de la formulación.

Se utilizó el accesorio esfera de integración para obtener los espectros de las muestras estándar y de las muestras problema, debido a que disminuyó variaciones espectrales causadas por el estado cristalino de las muestras, midió detalles espectrales muy pequeños y permitió obtener espectros reproducibles de muestras sólidas; estas características son muy importantes en el análisis cuantitativo.

En general se alcanzaron los objetivos propuestos para este trabajo de investigación, es decir, se desarrolló una metodología analítica que en forma directa cuantifica los fármacos simultáneamente, y presenta las siguientes características:

- Mínima preparación de las muestras. La lectura de la muestra se hace directamente, esto permite obtener los espectros rápidamente.

- No requiere una separación previa de los componentes.
- Análisis no destructivo. Mantiene la integridad de la muestra; para uso en el laboratorio la pérdida de la muestra no es un factor crítico, a no ser que las muestras o patrones sean muy caros o insuficientes para la realización de otros análisis, sin embargo, el análisis no destructivo se utiliza para evaluar materiales en línea de producción, puesto que se analizan las muestras a medida que se producen.
- No utiliza disolventes. No es tóxico, evita daños al medio ambiente y disminuye los costos de operación.
- Rapidez de análisis. Una vez que se establece la calibración se puede realizar el análisis de varias especies en pocos minutos, el tiempo de análisis varía de 30 segundos a 1 minuto por muestra, dependiendo de la computadora que se utilice. Lo que permite salvar gran cantidad de tiempo en estudios rutinarios de mezclas.
- Análisis de varios componentes simultáneamente. Se pueden cuantificar hasta 15 componentes a partir un sólo espectro, sin aislar bandas para cada especie de interés.
- El número de estándares que intervienen en la calibración es de al menos 3 veces el número de especies que intervienen en el análisis.
- Una vez que se establece la calibración, ésta puede operar por largos periodos de tiempo sin posteriores ajustes, siempre que se mantenga la

misma matriz. La calibración se puede monitorear con muestras de chequeo.

La metodología analítica desarrollada en el presente trabajo parece estar relativamente libre de errores, puesto que es un proceso sencillo. La muestra se pulveriza y se mezcla, se llena una celda y posteriormente se lee el resultado. Sin embargo, se identificaron algunos puntos que influyen en forma importante en el análisis, estos son: construcción de la curva de calibración, muestreo y tamaño de partícula; con los cuales se debe tener cuidado en el desarrollo de trabajos similares.

Construcción de la curva de calibración. Siempre que sea posible es aconsejable emplear un diseño experimental cuando se colectan los estándares de calibración, este punto es importante por dos motivos: el primero es evitar la colinearidad entre las muestras de calibración, es decir, evitar que la concentración de un componente varíe en forma constante con respecto a otro componente en el grupo de muestras de calibración; y el segundo, que los estándares en la curva de calibración presente una distribución uniforme en todo el intervalo de calibración seleccionado para cada componente. Uno de los diseños experimentales más útiles y que es recomendable aplicar en trabajos similares es el diseño experimental simplex el cual permite variar sistemáticamente las concentraciones dentro del intervalo establecido para cada componente, sin causar colinearidad.

Muestreo. El valor de la determinación analítica depende de que tan representativa es la muestra sometida al análisis. Se debe seleccionar una cantidad de muestra manejable, cuyas características deben corresponder tan cercanamente como sea posible a las características de la muestra problema. Aunque, están disponibles procedimientos de muestreo internacionalmente reconocidos, en un análisis práctico a menudo se lleva

cabo la selección de muestras al azar. Es recomendable utilizar un procedimiento de muestreo debido a que los errores originados cuando no se utiliza pueden ser mucho más grandes que aquellos originados del método analítico en sí mismo. Otro punto importante que está relacionado con el muestreo es, mezclar la muestra antes del análisis. Esto es particularmente importante en el caso de que las materias primas causen estratificación en la muestra, esto da lugar a la lectura de una alícuota no representativa.

Tamaño de partícula. La muestra se debe pulverizar hasta un tamaño de partícula uniforme. El efecto del tamaño de partícula sobre los espectros influye en la exactitud y precisión del análisis. Pulverizar la muestra es esencial para obtener buenos resultados.

Aunque ha habido un cambio gradual hacia el uso de la quimiometría en muchas de las áreas del análisis instrumental, todavía existe la tendencia a ver los métodos quimiométricos con escepticismo. Ésto, se debe a las dificultades que se presentan al interpretar la literatura y al manejar los paquetes de software que se utilizan en este campo. En el presente trabajo el estudio y comprensión del software representó muchas horas de investigación y prueba debido a la poca bibliografía existente sobre el tema.

El propósito de este trabajo de investigación ha sido informar sobre el potencial de la espectroscopia infrarroja con métodos quimiométricos y su aplicación en la cuantificación de materiales activos dentro de formas dosificadas farmacéuticas. Adicionalmente, la espectroscopia de infrarrojo con métodos quimiométricos presenta un gran potencial como una técnica analítica útil en varias facetas de fabricación farmacéutica. Otras aplicaciones potenciales son: estudios de estabilidad, uniformidad de contenido, estudio de mezclas, análisis en tiempo real, granulación y secado, imitación del producto, velocidad de dilución, formulaciones y uniformidad

de contenido. Por otra parte, esta metodología es aplicable a otras áreas de la química básica o industrial.

Son muchas las ventajas que presenta la espectroscopia infrarroja para análisis cuantitativo pero por si sólo no puede resolver todos los problemas analíticos, la espectroscopia infrarroja no compite con ninguna otra técnica, más bien se complementan; el número de aplicaciones de la espectroscopia infrarroja continua creciendo y serán limitadas únicamente por la imaginación del espectroscopista.

BIBLIOGRAFÍA

1. Helman, J. *Enciclopedia de farmacotecnia teórica y practica*. CECSA. México (1980).
2. Rosenstein S. E. *Diccionario de especialidades farmacéuticas*. 42 ed. Ediciones PLM. México (1996).
3. Goodman G. *Bases farmacológicas de la terapéutica*. 6a ed. Interamericana. México (1989).
4. Comisión permanente de la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. 6a ed. Secretaría de salud. México (1994).
5. Sayal A. K., Laha D. *Rapid Colometric Assay of Trimethoprim and Sulfamethoxazole in Pharmaceuticals*. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66, 1447-1449 (1983).
6. Turczan W. *Nuclear Magnetic Resonance Analysis of Pharmaceuticals. Determinatio of Sulfamethoxazole and Trimethoprim In Combination in Tablets*. Anal. Chem. Acta. 92, 123-128 (1977).
7. Rodriguez M. R., Pizzorno M.T., Albonico S. M. *NMR Determination of Trimethoprim and Sulfamethoxazole in Tablets and Powders*. J. Pharm. Sci. 66, 121-122 (1977).
8. Altersor C., Corbi P., Dol I., Kochen M. *Application of Experimental Design to the Development of a Multicomponent Derivative Spectrophotometric Method: Simultaneous Determination of Sulfamethoxazole and Trlmethoprim*. Analyst 118, 1549-1553 (1993).

9. Perkins W.D., Porro T.J., Pattacine S. *Fourier transform Infrared (FT-IR) spectroscopy of polymers and additives using product validation software techniques*. Perkin Elmer Infrared Bulletin. FT 02.02.04. Perkin Elmer Corporation. England (1992).
10. Spragg R.A. *The determination of OH number in polyols using FT-NIR spectroscopy*. Perkin Elmer Infrared Application Note. D-5006. England. Perkin Elmer Corporation. England (1996).
11. Spragg R.A. *Circum a program for quantitative multicomponent analysis of complex materials*. Perkin Elmer Infrared Bulletin. L990. Perkin Elmer Corporation. England (1986).
12. *Standard Test Method for determination of MTBE, ETBE, DIPE, Methanol, Ethanol and tert-butanol in gasoline by Infrared spectroscopy*. American society for testing and materials. D 5845 – 95.
13. *Practice for Infrared, multivariate, quantitative analysis*. Annual Book of ASTM Standards. Vol 03.06
14. *Standard practices for general techniques of Infrared quantitative analysis*. American society for testing and materials. E 168-92.
15. *Nir Integrating Sphere*. L-1437. Perkin-Elmer Corporation. England (1992).
16. Ciurczak E. W. *Pharmaceutical mixing studies using near-Infrared spectroscopy*. Pharmaceutical Technology. 15, 9 (1991).
17. Hernández A.G., Martínez R.A. *Quimiometría: Aplicaciones de técnicas matemáticas y estadísticas al procesamiento de datos experimentales*. Sociedad Química de México (1995).
18. Brown S., Bear R., Blank T. *Chemometrics*. Anal. Chem. 64, 22R-49R (1992).

19. *Quant+ User's Guide*. Perkin-Elmer Ltd. England. U.S. Pat. No 4701838. (1994).
20. Abrams C. B. *Basic Techniques and Experiments for 1600 Series FT-IR*. Perkin-Elmer. New York (1995).
21. Osborne B. G., Fearn T., Hindle P. H. *Practical nlr spectroscopy with applications in food and beverage analysis*. 2th ed. Longman Scientific & Technical. Singapore (1993).
22. Silverstein R. M., Bassier G. C., Morrill T. C. *Spectrometric Identification of organic compound*. 5th ed. John Wiley & Sons. U.S.A. (1991).
23. Skoog D.A., West D.M. *Química analítica*. 4a ed. McGraw-Hill (1988).
24. Osborne B. G., Fearn T., Hindle P. H. *Practical nlr spectroscopy with applications in food and beverage analysis*. 2th ed. Longman Scientific & Technical. Singapore (1993).
25. Koenig, J. L. *Spectroscopy of Polymers*. 2th ed. American Chemical Society. U.S.A. (1993).
26. Griffiths R., J. A. de Haseth. *Chemical Analysis. Fourier Transform Infrared Spectrometry*. V. 83. John Wiley & Sons. New York (1986).
27. Conley R.T. *Espectroscopia infrarroja*. Alhambra. España (1979).
28. Spragg R. A. *Horizontal ATR Accesory*. Perkin-Elmer Corporation. United Kingdom (1995).
29. Spragg R. A. *Nlr Integrating Sphere*. Perkin-Elmer Corporation. England (1992).
30. Ciurczak E. W. Burns D. A. *Handbook of NIR analysis*. U.S.A. (1990).

31. Thomas E. V. *A Primer on Multivariate Calibration*. Anal. Chem. 66 (15), 795A-804A (1994).
32. Fredericks P. M., Lee J. B., Osborn P. R. Swinkels D. A. J. *Materials Characterization Using Factor Analysis of FT-IR Spectra. Part 1: Results*. Appl. Spec. 39, 303-310 (1985).
33. Fredericks P. M., Lee J. B., Osborn P. R. Swinkels D. A. J. *Materials Characterization Using Factor Analysis of FT-IR Spectra. Part 2: Matematical and Statistical Considerations*. Appl. Spec. 39, 311-316 (1985).
34. PLSplus Application. Galactic Industries Corporation. U.S.A. (1993).
35. Haaland D. M., Thomas E. V. *Partial Least-Squares Methods for Spectral Analyses 1. Relation to Other Quantitative Callbration Methods and the Extraction of Qualitative Information*. Anal. Chem. 60, 1193-1202 (1988).
36. Haaland D. M., Thomas E. V. *Partial Least-Squares Methods for Spectral Analyses 2. Application to Simulated and Glass Spectral Data*. Anal. Chem. 60, 1202- 1208 (1988).
37. Spragg R. A. *An advanced quantitative analysis program for Infrared spectroscopy*. Perkin-Elmer Ltd. England (1994).
38. Spragg R. A. *Quant+ 3. A sophisticated quantitative analisis program for Infrared spectroscopy*. Perkin-Elmer Ltd. England (1993).
39. Nakanishi K. *Infrared absorption spectroscopy*. Holden Day. San francisco California. (1962).
40. Parikh V.M. *Absortion spectroscopy of organic molecules*. Addison-Wesley. U.S.A.
41. *System 2000 FT-IR Apilcatlions*. Perkin-Elmer. D5335. England. (1994).

42. McGrattan B.J., Schiering D. W. Hoult A. Robert. *Infrared spectral discrimination: The use of a filtering correlation function for materials characterization*. The Perkin Elmer Corporation. England. (1990).
43. Sprag R., Smith T. *Verification of materials using COMPARE*. England. (1992).
44. Juran M. *Quality control Handbook*. 3th ed. McGraw-Hill Book Company. U.S.A. (1974).
45. *Guía de procedimientos adecuados de laboratorio analítico*. Monografía técnica No. 2. CIPAM. (1989).
46. *QUANT+ Reference Manual*. Perkin-Elmer Ltd. England. U.S. Pat. No 4701838. (1994).
47. Koheler H. *Estadística para negocios y economía*. Compañía editorial continental. México (1996).
48. Miller J.C. Miller J.N. *Estadística para química analítica*. 2a. ed. Addison-Wesley Iberoamericana. E.U.A. (1993).
49. While R.G. *Handbook of Industrial Infrared Analysis*. Phenom Press. U.S.A. (1980).