



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE COCAÍNA EN POLVO POR FTIR”

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO.

PRESENTA:

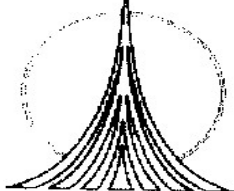
VARGAS BAUTISTA VLADIMIR

ASESOR:

M. EN C. A. LOURDES CASTILLO GRANADA

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE DEL 2006





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.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Inocencio Vargas y Eugenia Bautista.

Con la mayor gratitud por los esfuerzos realizados para que yo lograra terminar mi carrera profesional, siendo para mí la mejor herencia.

Con amor respeto y admiración

A mi esposa:

Carmina Muñoz.

Gracias amor: Por tu apoyo y comprensión recibidos en la elaboración de este trabajo; y por todo ese amor que me brinda y me hace sentir completo.

A mis Hermanas:

Tania, Yunuen, Deny Alhelí.

Que siempre han estado presentes y que me han ayudado a mantener lo más sagrado de mi vida, mi familia

A mi asesor:

M. en C. A. Lourdes Castillo Granada.

Por la paciencia el tiempo y conocimientos que me brindo, gracias por la dedicación y profesionalismo, una de tantas cualidades, a lo cual debo la terminación de este trabajo.

A mi escuela:

FES-ZARAGOZA

Por ser esa gran institución en la que encontré en cada uno de sus maestros un pilar para la formación de mi carrera, compartiendo sus conocimientos y experiencias, dando un gran futuro, triunfos y satisfacción a todo aquel que es parte de ella. En la cual hice muchos amigos que no olvidaré

Mis sinodales:

Por cada uno de sus consejos y asesorías para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

| | | PÁGINA |
|---------|-----------------------------------|--------|
| | Índice | 1 |
| | Lista de figuras | 3 |
| | Lista de tablas | 3 |
| | Resumen | 4 |
| 1 | Introducción | 6 |
| 2 | Fundamentación del tema | 8 |
| 2.1 | Propiedades físicas y químicas | 8 |
| 2.2 | Historia de la cocaína | 9 |
| 2.3 | Farmacología | 11 |
| 2.4 | Métodos de análisis | 13 |
| 2.4.1 | Métodos preliminares (Screen) | 14 |
| 2.4.2 | Métodos analíticos instrumentales | 17 |
| 2.5 | Espectrofotometría en el IR | 18 |
| 2.5.1 | Antecedentes históricos | 18 |
| 2.5.2 | Principios teóricos | 22 |
| 2.5.3 | Instrumentos | 26 |
| 2.5.3.1 | Instrumentos dispersivos | 26 |
| 2.5.3.2 | Instrumentos no dispersivos | 29 |
| 2.5.4 | Aplicaciones | 34 |
| 2.5.4.1 | Análisis cualitativo | 35 |
| 2.5.4.2 | Análisis cuantitativo | 36 |
| 2.6 | Validación del método analítico | 42 |

| | | |
|-----|----------------------------|----|
| 3 | Planteamiento del problema | 52 |
| 4 | Objetivos | 53 |
| 5 | Método | 54 |
| 5.1 | Material | 54 |
| 5.2 | Equipo e instrumentos | 54 |
| 5.3 | Reactivos | 55 |
| 5.4 | Procedimientos | 55 |
| 6 | Conclusiones | 59 |
| 7 | Referencias bibliográficas | 61 |

FIGURAS

| | DESCRIPCIÓN | PÁGINA |
|----------|--|--------|
| Figura 1 | Estructura química de la cocaína. | 8 |
| Figura 2 | Pruebas directivas para alcaloides. | 15 |
| Figura 3 | Movimientos vibracionales de las moléculas. | 25 |
| Figura 4 | Espectrofotómetro dispersivo | 27 |
| Figura 5 | Espectrofotómetro no dispersivo | 30 |
| Figura 6 | Formas de dibujar la línea base en una señal de absorción. | 39 |
| Figura 7 | Maneras de medir la absorbancia en un espectro en el infrarrojo. | 41 |

TABLAS

| | DESCRIPCIÓN | PÁGINA |
|---------|---|--------|
| Tabla 1 | Técnicas espectrofotométricas y sus aplicaciones. | 18 |
| Tabla 2 | División del infrarrojo. | 22 |
| Tabla 3 | Instrumentación de un sistema dispersivo. | 28 |
| Tabla 4 | Instrumentación de un sistema no dispersivo. | 29 |

RESUMEN

Hoy en día, es necesario contar con métodos analíticos para identificar y cuantificar cualquier sustancia química, independiente del estado físico en que se encuentre. Dentro de estas sustancias químicas las drogas de abuso, tales como la cocaína ocupan un lugar importante en la aplicación de los métodos analíticos.

La posibilidad de realizar determinaciones analíticas cada vez más precisas y exactas así como obtener límites de detección y límites de cuantificación más bajos para la identificación cualitativa y cuantitativa de cualquier sustancia ha dejado de lado el uso de los métodos gravimétricos y volumétricos, y se ha permitido el desarrollo los Métodos de Análisis Instrumental.

Dentro de estos métodos destacan los espectrofotométricos, los cuales se basan en la propiedad de una sustancia de absorber radiación desde alguna región del espectro electromagnético como puede ser la ultravioleta (UV), visible, e infrarroja (IR), entre otras, y a través de un sistema electrónico obtener el valor de una propiedad determinada ^(1,2,3).

El método desarrollado en el presente trabajo consiste en realizar una extracción del principio activo en cloroformo y efectuar la lectura directa del extracto en comparación con una muestra de referencia.

En México la Ley General de Salud, que regula las actividades de los establecimientos que se dedican a la producción de medicamentos u otras sustancias, asigna un estatuto legal a esta actividad al establecer que los controles analíticos de materias primas, productos en proceso y productos terminados, deben demostrar ser confiables mediante el proceso de validación ⁽¹⁾.

En la presente revisión bibliográfica se realiza el estudio para el desarrollo de un método analítico cualitativo y cuantitativo por Espectroscopia en el Infrarrojo con Transformadas de Fourier, para el análisis de la cocaína en polvo, así como su validación ⁽⁴⁾.

Se revisa de igual forma la validación del mismo método analítico para mostrar que sea lineal, exacto, preciso y específico, además de ser rápido, y pueda ser utilizado de manera confiable como prueba cualitativa y cuantitativa ⁽⁵⁾.

1. INTRODUCCIÓN

La cocaína, es un alcaloide que se obtiene de las hojas de la planta de la coca y que se llegó a emplear con fines médicos como anestésico local. También, posee un uso muy extendido como droga de abuso. Las culturas del imperio Inca masticaban las hojas de la coca para obtener una leve euforia, estimulación y un estado de alerta.

Este compuesto fue aislado por primera vez en 1860, pero nadie prestó interés hasta que en 1893 un militar, físico alemán, el Dr. Theodor Aschenbrant, consiguió un suministro de cocaína pura y lo repartió entre los soldados Bávaros durante las maniobras de otoño e informó del aumento de la competencia de los soldados para soportar el cansancio. Un lector quedó encantado con los informes del Dr. Aschenbrant, el fue un joven neurólogo vienés, de veintiocho años, el Dr. Sigmund Freud, quien descubrió que se trataba de una droga psicoactiva, quedando confirmado ampliamente, en investigaciones posteriores. Otros estudios, describieron que el uso repetitivo de grandes dosis de cocaína producía psicosis paranoide en casi todos los que la habían utilizado, aumentando progresivamente, la tendencia a su abuso ⁽⁶⁾.

El tráfico de drogas, consiste en facilitar o promocionar el consumo ilícito ajeno de determinadas sustancias estupefacientes y adictivas que atentan contra la salud pública con fines lucrativos, aunque esta definición puede variar según las distintas legislaciones penales de cada Estado.

En los artículos 193 al 199 del Código Penal de nuestro país se dispone y castiga a toda persona que produzca, transporte, trafique, comercialice o suministre aún gratuitamente toda materia de narcóticos y estupefacientes sin autorización correspondiente en la ley general de salud, dentro de los cuales esta incluida la cocaína. Las penalizaciones que se aplican en los diferentes casos son determinadas dependiendo de la cantidad decomisada y de la pureza (entre mayor pureza y cantidad, mayor penalización) ^(7,8).

Dentro del área de laboratorio se requiere la identificación y cuantificación de cualquier tipo de polvo o sustancia sospechosa de contener cocaína, por lo cual se han ido realizando diferentes técnicas para su estudio hasta llegar a determinaciones instrumentales como lo son los espectros de masas, infrarrojo y resonancia magnética nuclear, principalmente ^(9,10).

2. Fundamentación del tema

2.1 Propiedades físicas y químicas

Cocaína: Metil éster del ácido [1*R*-(exo,exo)]-3-(Benzoiloxi)-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxílico (Figura 1)

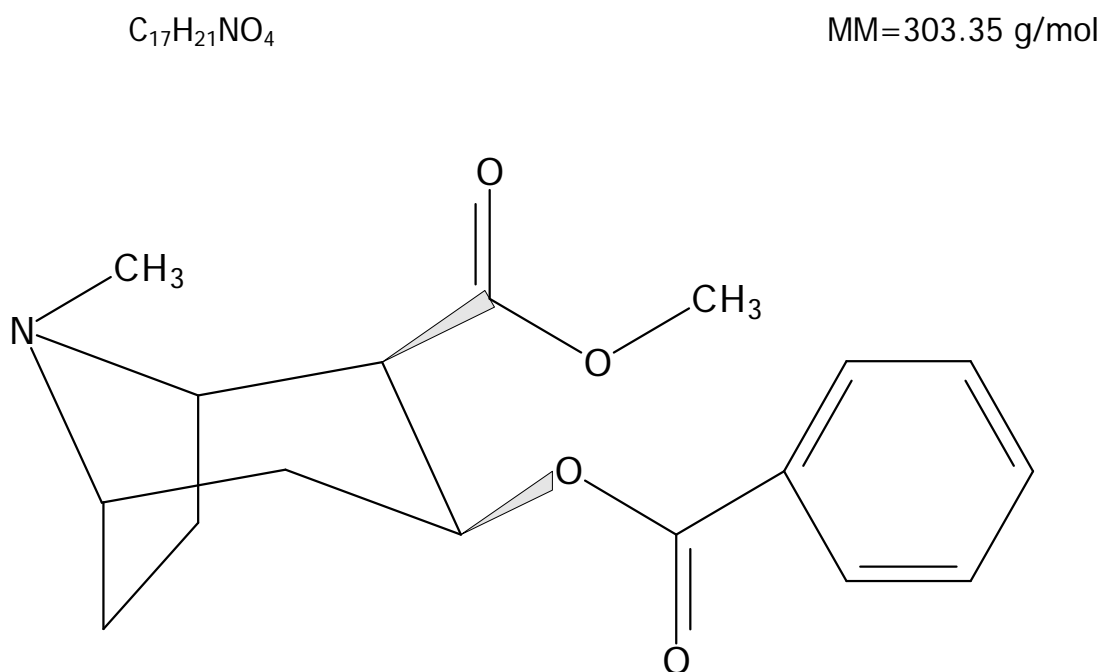


FIGURA 1. Estructura química de la cocaína ⁽¹¹⁾.

La cocaína también conocida como Benzoato 3β-hidroxi-1α*H*,5α*H*-tropano-2β-metoxicarbonilo. Genéricamente recibe varios nombres como: clorhidrato de cocaína, cocaína muriata, neurocaina hidrociorada, benzometil egoína ^(11,12).

Descripción: Cristales incoloros a blancos; fácilmente volátiles; inodora; funde alrededor de 98° C; solución levógira (en HCl diluido); la solución saturada es alcalina frente al tornasol; tienen un pKa (15°) de 8.61 y pKb (15°) de 5.59 (11,13).

Solubilidad. Es muy soluble (1 gramo): en 0.7 mL de cloroformo; fácilmente soluble: 6.5 mL de alcohol, 3.5 mL de eter; soluble: 12 mL de aceite de olivo; poco soluble: 30-50 mL de petrolato líquido; ligeramente soluble: en 600 mL de agua, 270 mL de agua a 80°; también es soluble en acetona, acetato de etilo y disulfuro de carbono (11,12,13,14).

Usos: La cocaína es agente anestésico local tópico (oftálmico), vasoconstrictor y potente estimulador del sistema nervioso central. Se emplea una solución al uno ó dos por ciento para la anestesia de oído, nariz, garganta, recto y vagina. Para su aplicación tópica (oído, nariz, garganta) se utilizan concentraciones del cuatro por ciento a diez por ciento (4,14,15).

2.2 Historia de la cocaína

Cuando los conquistadores españoles llegaron a las montañas andinas, observaron el uso de hojas de la planta de coca (*Erythroxylon coca*) por algunos de los residentes. Las hojas del pequeño árbol o arbusto eran masticadas, junto con algún álcali (cal o ceniza), para liberar la base la cual es de rápida absorción a través de la mucosa. En ese tiempo, las hojas de coca eran usadas como una droga ritual sólo por la élite de los Incas y no por los

administradores ni labriegos de la nación Inca. El pueblo esclavizado que la consumía pudo trabajar continuamente durante más de un día sin alimento ni sueño, aun en las grandes altitudes ⁽¹⁶⁾.

Las hojas de la planta peruana llegaron al laboratorio de Wöhler, el primer químico en sintetizar un compuesto orgánico. Su discípulo, Nieman, aisló la cocaína en 1860 y notó el efecto anestésico en su lengua.

Después de la guerra civil norteamericana, la cocaína fue prescrita por algunos médicos americanos para el tratamiento específico contra la adicción a la morfina. Sigmund Freud estuvo entre los que usaron y recomendaron a otros el uso de la cocaína como un euforígeno. Así, cuando un colega que se había vuelto adicto a la morfina por consumirla para controlar el dolor causado por la amputación de un miembro consulto a Freud; quien le recomendó sustituir la morfina por cocaína, sin embargo teniendo como consecuencia la adicción a ella ^(16,17).

Sigmund Freud y su jefe, Joseph Breuer, invitaron a un oftalmólogo joven, Carl Koller, a colaborar en diversos estudios. Freud estaba muy interesado en los efectos generales de la cocaína, pero Koller había probado muchos medicamentos como anestésicos locales en el ojo sin éxito, probó la cocaína para tal fin y se le da el crédito a Koller (1884) de haber introducido el concepto de anestesia local y el empleo de la cocaína para tal fin ^(16,18).

Todavía hoy la cocaína es utilizada por los indígenas sudamericanos y en grado limitado por los consumidores de la droga en cualquier otra parte, quienes la consumen ya sea por inhalación, fumada o por inyección intravenosa, solo o en combinación con heroína ^(19,20).

2.3 Farmacología

Para cada clase de droga y para cada droga individual, se debe considerar los posibles patrones de mal uso, el efecto del abuso sobre el individuo y el efecto sobre la sociedad. La cocaína es generalmente inhalada o aspirada y se absorbe rápidamente en la mucosa faríngea. Ordinariamente se usa como una droga de fiesta o de parranda ⁽¹⁶⁾.

La cocaína empleada como anestésico local, ejerce su efecto en gran manera sobre la zona circunscrita. Sin embargo, se absorbe a partir del lugar de inyección y puede ejercer efectos sistémicos, en especial sobre el sistema cardiovascular y el sistema nervioso central, y particularmente cuando se emplea en dosis excesiva, puede bloquear la conducción a lo largo del cilindro eje y puede impedir al órgano sensorial que inicie un impulso eferente. Las fibras motoras y autonómicas también son bloqueadas, y se tienen efectos tóxicos después de que se absorbe.

La cocaína y las píldoras dietéticas (anfetaminas) son estimulantes simpaticomiméticos, causan una estimulación placentera o euforia que conduce a su abuso frecuente ^(15,19).

Según algunos datos, parece haber una reserva de norepinefrina, acumulada tal vez en las células cromafínicas de los tejidos con inervación simpática. Esta reserva se moviliza bajo un tratamiento con reserpina.

Las aminas simpaticomiméticas, como la tiramina, actúan únicamente cuando existe esta reserva, y no tiene acción cuando ésta ha sido movilizada.

Parece que la cocaína bloquea la liberación de la reserva de aminas, por lo cual se anula la acción de la tiramina y desaparece el desalojamiento espontáneo de la reserva, que es el responsable de la baja sensibilidad a la norepinefrina.

Normalmente la reserva de norepinefrina en el corazón y paredes vasculares proviene de la sangre, y la desaparición de la norepinefrina se debe, en parte, a este mecanismo y no solamente a su destrucción. La cocaína puede prevenir la absorción por parte de los tejidos almacenadores ⁽²¹⁾.

La cocaína es demasiado tóxica para ser inyectada en los tejidos, por consiguiente se utiliza tan sólo de forma tópica. Produce una excelente anestesia tópica y vasoconstricción que da lugar a una contracción de las membranas mucosas. La absorción a partir de la mucosa urinaria es rápida y la cocaína no debe utilizarse en estas zonas. Algunos clínicos creen que la vasoconstricción con cocaína al 10 por ciento es mejor que con la solución al cuatro por ciento y que la toxicidad es inferior con los preparados más fuertes, por que la cocaína se absorbe de una forma más lenta. El efecto

vasoconstrictor de la cocaína y la potenciación por este anestésico local de las acciones de las catecolaminas probablemente sean consecuencia de la inhibición de la captación de las catecolaminas por parte de las terminales nerviosas adrenérgicas ⁽¹⁹⁾.

2.4 Métodos de análisis

En la actualidad existe una gran variedad de técnicas analíticas que van desde las clásicas (reacciones colorimétricas, pruebas microcristalinas, entre otras) hasta las técnicas analíticas instrumentales modernas (HPLC, RMN, IR, EM, UV).

En efecto, el análisis químico ha experimentado en los últimos años un considerable desarrollo, caracterizado esencialmente por el empleo de instrumentos, capaces de medir propiedades físicas o químicas que permiten la identificación de los compuestos. Estas técnicas instrumentales presentan como ventaja una mayor precisión y exactitud sobre los métodos analíticos clásicos.

La toxicología forense, por el extenso campo de aplicación, ha sido una de las disciplinas más beneficiadas por el desarrollo de las técnicas analíticas instrumentales, incorporado muchas de ellas en sus métodos de trabajo, lo que permite una simplificación de los procedimientos de análisis y un notable incremento en la sensibilidad y precisión ⁽²²⁾.

Parte del trabajo del laboratorio judicial o legal es ayudar a determinar el tipo de crimen y la persona que lo cometió. Así en el área del análisis cualitativo y

cuantitativo de drogas de abuso, el laboratorio encargado de estos análisis, deberá aplicar los métodos preliminares (screen), los cuales generalmente involucran desarrollo de color, seguido por los métodos instrumentales de análisis.

2.4.1 Métodos Preliminares (Screen)

Estas son pruebas preliminares de identificación de una posible droga, se realizan en base a los grupos funcionales presentes en la estructura química de ciertas drogas. Las evidencias físicas recolectadas son analizadas por una determinación rápida, se puede obtener un resultado positivo o negativo, esta información nos va dirigiendo hacia la droga tentativa, tal como se muestra en la Figura 2 ^(23,24,25).

En estas pruebas se utilizan de 1-2 mg de la muestra desconocida (supuesta droga de abuso), dentro de un tubo de ensayo en el que se lleva a cabo alguna de las siguientes reacciones para alcaloides:

- REACCIÓN DE MAYER: Disolver 0.68 g de cloruro de mercurio y 2.5 g de ioduro de potasio, aforar a 100 mL con agua.
- REACCIÓN DE DRAGENDORFF: Solución A; disolver 0.85 g de subnitrito de bismuto en 50 mL de ácido acético acuoso al 20%. Solución B; Disolver 8 g de ioduro de potasio en 20 mL de agua. La preparación del concentrado es 5:2 (v/v) del reactivo A y del B. Para la preparación de la solución de trabajo, se toman 10 mL de la solución concentrada, se aforan a 100 mL con agua.
- REACCIÓN DE WAGNER: Mezclar 1.27 g de yodo con 2 g de ioduro de potasio, aforar a 100 mL con agua destilada.

En las tres pruebas la formación de un precipitado se considera una reacción positiva para alcaloides.

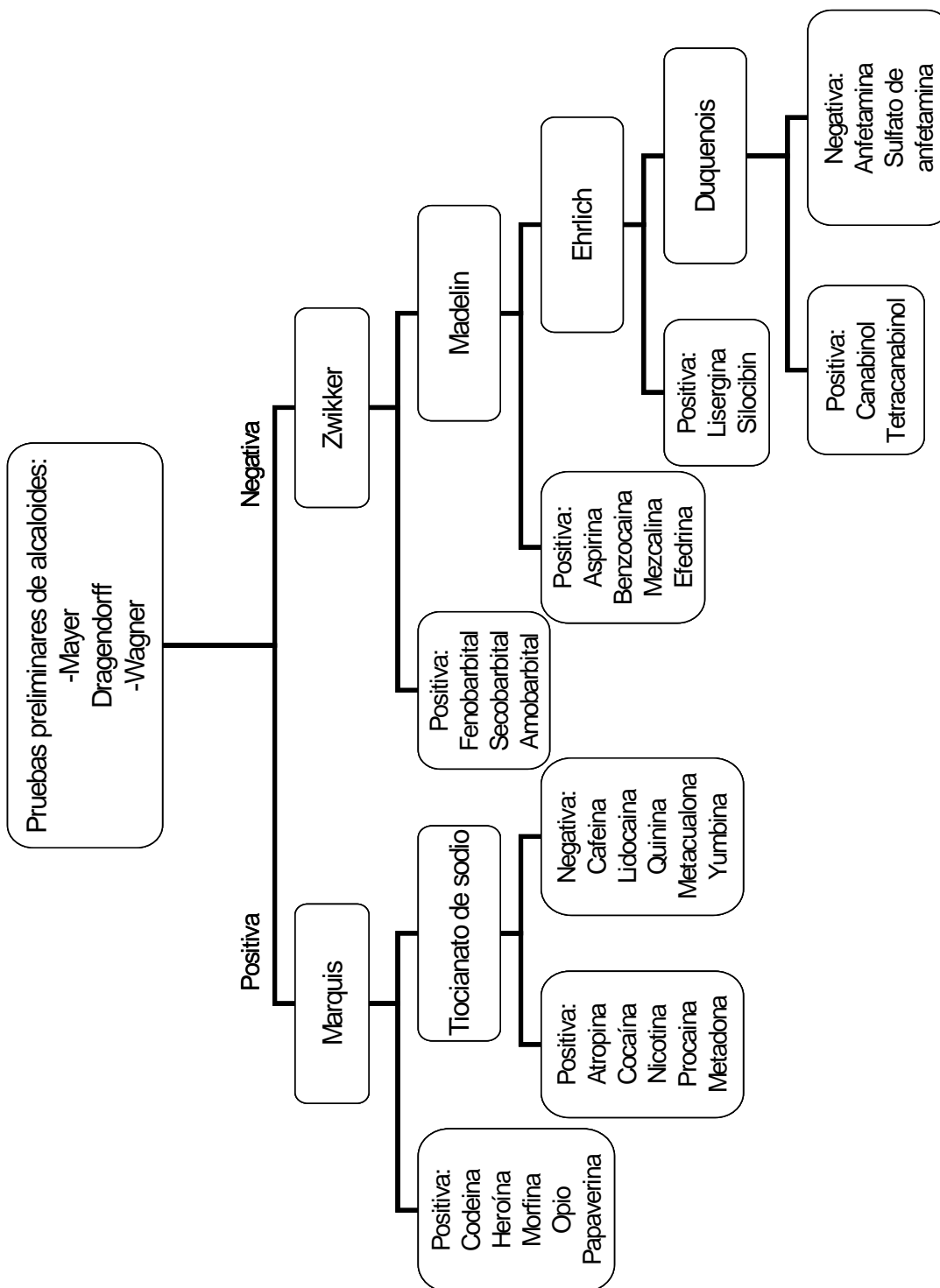


FIGURA 2. Pruebas directivas para alcaloides (24).

En el caso de la cocaína, la prueba posterior positiva para alcaloide, se realiza la prueba de Marquis y posteriormente la de Tiocianato de cobalto, es posible pasar directamente a esta última. La prueba de Marquis es para la detección de opiáceos y debe dar negativo para así continuar con la de Tiocianato de cobalto que es para la identificación de cainas tipo procaína y cocaína en la cual se espera un resultado positivo.

REACCIÓN DE MARQUIS: Mezclar al momento de realizar la reacción, 10 mL de ácido sulfúrico concentrado con 8-10 partes de formaldehído al 40%. Se colocan de 1-2 mg de la muestra desconocida en un tubo de ensayo y se agregan dos gotas de reactivo de Marquis, el cual de ser positivo pasará de un color púrpura intenso a un azul violáceo, de no ser así, no se observará algún cambio.

REACCIÓN DE TIOCIANATO DE COBALTO: En un tubo de ensayo colocar dos gotas del reactivo de Tiocianato de cobalto al dos por ciento y se adiciona 1-2 mg de la muestra desconocida, la formación de un precipitado azul turquesa será el indicativo de una reacción positiva ⁽²³⁾.

Las pruebas microcristalinas son otras pruebas rápidas que se pueden utilizar para la detección de cocaína, en este caso una muestra de la supuesta droga de abuso se observa al microscopio y se le adicionan diferentes soluciones reveladoras como: cloruro de mercurio, permanganato de potasio, Iodo, dentro de otros. Cada una de las soluciones dan una forma específica de los cristales de cocaína ⁽¹⁷⁾.

2.4.2 Métodos analíticos instrumentales

Dentro de los métodos analíticos de análisis instrumentales utilizados para la identificación de la cocaína tenemos los métodos espectrofotométricos, y los métodos cromatográficos ⁽²⁶⁾.

Los métodos espectrofotométricos basados en la absorción de radiación electromagnética, como resultado de su interacción con la materia se incluyen: rayos X, ultravioleta (UV), visible (V), infrarrojo (IR), espectrofotometría de masas (EM), resonancia magnética nuclear (RMN), absorción atómica (AA), y fluorescencia atómica ⁽¹⁴⁾.

La interacción entre una molécula y la radiación electromagnética origina un cambio en la energía electrónica o en la energía cinética de la molécula o en ambas. En la Mayoría de los casos, la energía absorbida se convierte rápidamente en energía de tipo vibracional, rotacional y traslacional ^(14,27).

Las técnicas espectrofotométricas se basan en la capacidad que tienen las moléculas y los átomos de absorber radiaciones de diferente longitud de onda, característica para cada sustancia. En la Tabla 1 se muestra la aplicación de estas técnicas.

| Técnicas | Aplicaciones | |
|----------------------|--------------|--------------------------|
| | Compuestos | Análisis |
| U.V., visible | Orgánicos | Cualitativo/cuantitativo |
| Espectrofluorometría | Orgánicos | Cualitativo/cuantitativo |
| I.R. | Orgánicos | Cualitativo/cuantitativo |
| E.M. | Orgánicos | Cualitativo |

TABLA 1. Técnicas espectrofotométricas y sus aplicaciones (22).

En los átomos, estos cambios se refieren exclusivamente a transiciones electrónicas. En las moléculas los cambios energéticos son debidos a movimientos electrónicos, así como a movimientos de vibración y rotación de la molécula.

2.5 Espectrofotometría en el IR

2.5.1 Antecedentes históricos

Las investigaciones sobre la utilidad de la región infrarroja del espectro electromagnético, tienen una larga historia. El descubrimiento de energía radiante más allá del final del rojo de la región visible fue realizado por el

astrónomo Sir William Herschel, en 1800. él midió la energía térmica de la luz del sol al colocar un termómetro en esta radiación después de ser dispersada por un prisma, observando el efecto calorífico de diferentes partes del espectro y descubriendo las altas temperaturas que se dan después de la región roja del espectro visible.

Investigaciones en esta región se realizaron lentamente. El progreso fue limitado primero por la necesidad de usar "placas fotográficas". Para la detección de señales de absorción. En 1882 Abney y Festing reportaron interesantes resultados que daban la relación existente entre grupos atómicos y líneas de absorción de una serie de 52 compuestos de 0.7 a 1.2 μm que fue el límite de sensibilidad de esas "placas fotográficas". También, demostraron que algunas de esas absorciones eran características de compuestos con grupos etilo o de compuestos con anillo de benceno.

Por 1890, Ångström extiende las investigaciones de algunos compuestos a 8 μm , usando un bolómetro y un prisma de cloruro de sodio, es así como descubrió señales de absorción del monóxido de carbono, dióxido de carbono, disulfuro de carbono y algunos hidrocarburos simples ^(28,29).

Un trabajo más extenso involucró espectros de absorción de 20 compuestos orgánicos en la región de los 10 μm , reportado por Julios en 1892. Él descubrió que todos esos compuestos contenían un grupo $-\text{CH}_3$ al mostrar una señal de absorción a 3.45 μm . Llegó a la importante conclusión de que la absorción de ondas de calor es debida a movimientos intramoleculares.

Por 1898, se observó que las señales de absorción del vapor de agua se encontraban en una región más lejana dentro del infrarrojo (20 μm). La cristalización del agua, similitudes y diferencias entre los isómeros del xileno, y el movimiento de las señales de absorción debido a la presencia de disolventes, se dieron a conocer por el año de 1900 ^(29,30).

Uno de los trabajos más amplios fue el de un físico del instituto Carnegie de Washington, William W. Coblentz, quien trabajó ignorado por los químicos de su época sus estudios los inició en 1903 mientras era estudiante graduado de la Cornell University. Para 1905, Coblentz había reconocido claramente el potencial de la espectroscopia en el infrarrojo como una herramienta para el análisis químico. En 1910, obtuvo el espectro de absorción de un gran número de sustancias y dio las bases para algunas correlaciones usadas hoy en día ⁽²⁹⁾.

A mediados de los años 30's y principios de los 40's investigaciones en el área de la química tales como las de H. W. Thomson y G. B. B. M. Sutherland en Inglaterra y de J. Lecomte en Francia, extendieron rápidamente los fundamentos para la aplicación de esta técnica en la elucidación de la estructura molecular. De esta manera, en 1935, comenzaron a utilizarse los primeros espectrofotómetros en el infrarrojo para trabajos teóricos en moléculas pequeñas ^(29,31).

Bajo la presión de la Segunda Guerra Mundial (1939-1945), se empezaron a utilizar las nuevas técnicas para el estudio de largas y complejas moléculas.

Estos esfuerzos fueron altamente fructíferos, particularmente en el campo del hule sintético y en la química del petróleo.

Los espectrofotómetros de infrarrojo de un solo haz fueron comercialmente disponibles en 1944. En estos instrumentos la difracción de la luz se hacía por medio de un prisma ^(26,31).

En 1947 se dio un cambio radical cuando Baird Associates introdujeron al mercado los primeros espectrofotómetros de doble haz, que automáticamente registraban la transmitancia contra la longitud de onda, instrumentos similares fueron producidos por Perkin-Elmer y Beckman Instruments en los Estados Unidos y por Hilger & Wats en Inglaterra ⁽³¹⁾.

Todos estos instrumentos sufrieron una serie de innovaciones, hasta llegar a los modernos espectrofotómetros manejados por microprocesador. El primero de esta generación llegó al mercado en 1988 y fue denominado: Espectrofotómetro de Infrarrojo con Transformador de Fourier; el cual, en lugar de dispersar la luz, utiliza un interferómetro del que se obtiene una señal llamada interferograma, a este patrón de interferencia se le aplican las ecuaciones de Transformadas de Fourier por medio de una computadora que lo convierte al final en un espectro típico en el infrarrojo. Entre las ventajas que ofrecen estos instrumentos, con respecto a los dispersivos, se encuentran su mayor sensibilidad y resolución, además de que permiten llevar a cabo análisis más rápidos ^(29,30,32).

La introducción de esos instrumentos marcó el principio de un periodo revolucionario de crecimiento para las aplicaciones químicas del infrarrojo.

2.5.2 Principios teóricos

La región infrarroja, localizada entre las regiones del visible y las microondas, corresponde al intervalo de longitud de onda entre 0.75 y 500 μm o, en número de onda, de 14286 a 20 cm^{-1} (29,33,34).

Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de los instrumentos es conveniente que la región infrarroja del espectro se divida en tres partes: infrarrojo cercano, medio y lejano. En la Tabla 2 se indican los límites de cada una (3,29,35).

| DIVISIÓN | INTERVALOS EN LONGITUD DE ONDA(λ) mm | INTERVALOS EN NÚMERO DE ONDA ($\bar{\nu}$) |
|------------|--|--|
| IR Cercano | 0.75 a 2.5 | 14286 a 4000 |
| IR Medio | 2.5 a 25 | 4000 a 400 |
| IR Lejano | 25 a 500 | 400 a 20 |

TABLA 2. División del infrarrojo (35).

El intervalo más común para el análisis cualitativo y cuantitativo de moléculas orgánicas es el existente entre los 2.5 a 16 μm (4000 a 625 cm^{-1}), localizado en el infrarrojo medio ⁽¹⁴⁾.

Para entender las causas por las cuales una molécula orgánica absorbe la radiación infrarroja, es necesario tomar en cuenta algunas consideraciones importantes.

Una molécula no es un conjunto rígido de átomos como lo suponen varias representaciones, más bien se puede comparar con oscilador armónico simple las esferas de diferente tamaño representan a los átomos de las moléculas y los resortes de longitudes variables corresponden a los enlaces químicos ⁽²⁹⁾.

De esta forma, las posiciones relativas de los átomos de una molécula con uniones covalentes no están exactamente fijas, sino que cambian continuamente como consecuencia de diferentes vibraciones. La energía necesaria para que las moléculas efectúen estos movimientos vibracionales es del orden del contenido energético de la radiación infrarroja ^(27,29,35,36).

Al interactuar las moléculas con la radiación IR, algunas de las porciones de la radiación incidente se absorben a determinadas longitudes de onda. Las múltiples vibraciones que ocurren en forma simultánea producen un espectro de absorción altamente complejo que depende de las características de los enlaces en grupos funcionales ^(27,36).

Los mismos grupos funcionales presentes en diferentes moléculas absorben radiación infrarroja a frecuencias similares, y las señales obtenidas tienen la misma intensidad, esas señales son predecibles y sirven al analista para elucidar, comprobar y cuantificar un compuesto en particular.

La frecuencia e intensidad de las señales de absorción infrarroja exhibidas por un compuesto químico caracterizan únicamente a ese material ^(27,30).

Para que la radiación IR sea absorbida por una molécula, se deben cumplir dos condiciones. Primero, la molécula debe poseer una frecuencia vibracional idéntica a la de la radiación incidente. La molécula absorberá entonces la energía radiante aumentando su vibración natural. En segundo lugar, la vibración debe ir acompañada de un cambio neto en la magnitud o dirección del momento dipolo ^(14,29,36).

La espectroscopia IR implica movimientos vibracionales de los enlaces presentes en una molécula que corresponden a dos categorías básicas "Stretching" o de extensión (estiramiento, alargamiento, tensión) y "Bending" o flexión (deformación) ^(24,27,35,36):

a) Stretching o extensión (Figura 3). Este tipo de vibración supone un cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos sin que exista variación en el ángulo de enlace, puede ser simétrica o asimétrica. En el estiramiento simétrico los dos átomos se mueven a distancias iguales en direcciones opuestas, con respecto al átomo central. En el estiramiento asimétrico, los centros donde se encuentran las cargas positivas y la negativa se mueven de tal manera que el centro eléctrico del grupo se desplaza alejándose del átomo central ^(27,29,35).

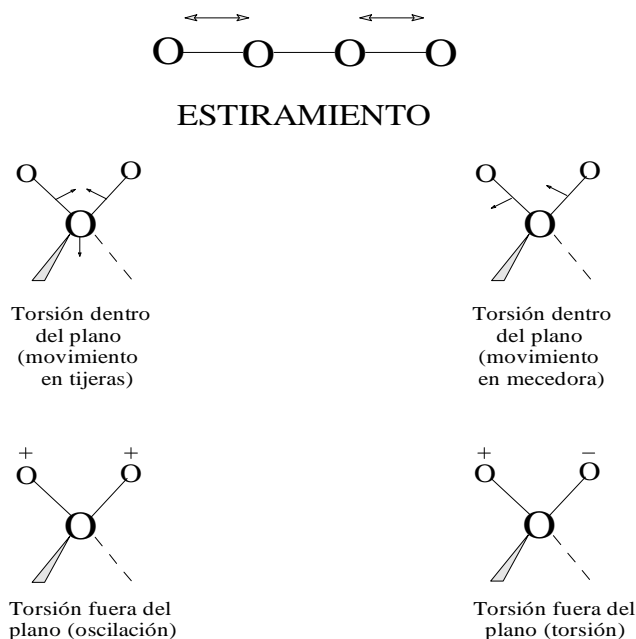


FIGURA 3. Movimientos vibracionales de las moléculas (35,36).

b) Bending o flexión (Figura 3). Se caracterizan por un cambio en el ángulo de dos enlaces (la posición de los átomos varía en relación al eje de enlace original). Se consideran 4 tipos: oscilación, tijeras, sacudida y torsión (27,29,35,36).

Para expresar la posición de las señales de absorción, se emplea la longitud de onda o el número de onda en cm^{-1} , éste último es el inverso de longitud de onda expresada en centímetros, donde:

$$\bar{\nu} = 1/\lambda$$

$$\bar{\nu} = \text{No. de onda}$$

$$\lambda = \text{longitud de onda en cm.}$$

De esta manera, el número de onda representa el número de ondas de la radiación contenidas en un centímetro ⁽³⁵⁾.

El espectro de infrarrojo puede ser obtenido de materiales en estado sólido, líquido ó gaseoso ⁽²⁷⁾.

2.5.3 Instrumentación

Los instrumentos utilizados en el infrarrojo pueden agruparse en dos categorías: dispersivos y no dispersivos ⁽³⁶⁾.

2.5.3.1. Instrumentos dispersivos.

En la Figura 4 se muestran los principales componentes de un espectrofotómetro de infrarrojo dispersivo ^(31,35,36,37):

- a) Fuente de radiación.
- b) Sistema dispersivo.
- c) Detector.

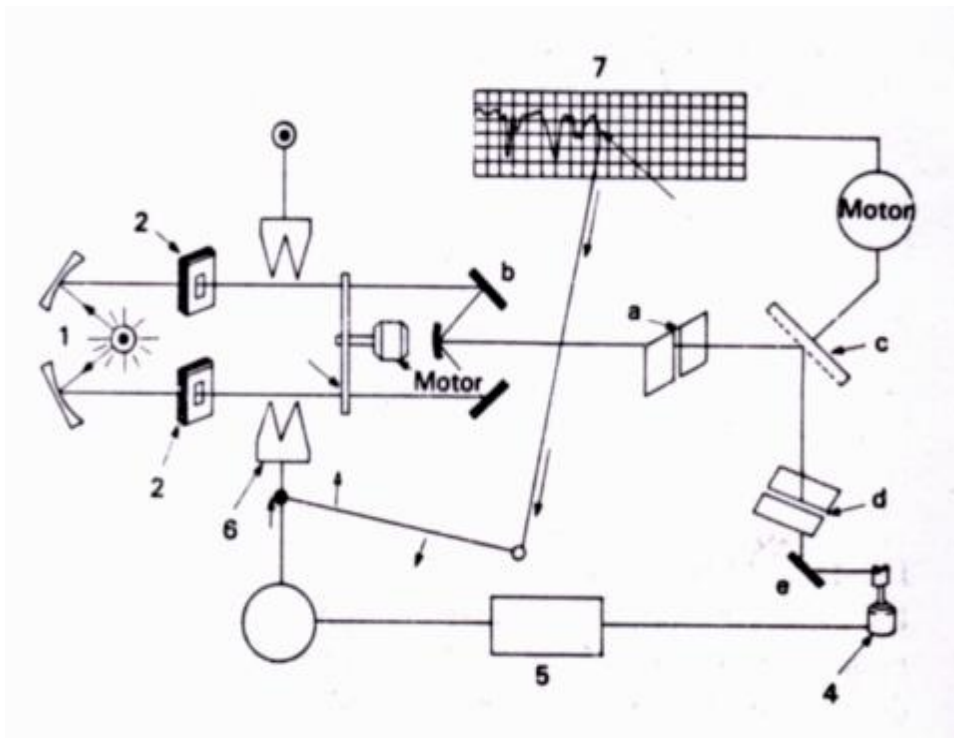


FIGURA 4. Espectrofotómetro dispersivo (37).

En un instrumento dispersivo de doble haz, la luz policromática de una fuente infrarroja se divide en dos haces iguales, uno es el haz de referencia y el otro el haz de la muestra; para unirse, antes de pasar a través de un espejo sectorial o “choper” (divisor de haz) cuya función es dejar pasar intermitentemente la luz proveniente de la muestra y de la referencia, estas dos señales pasan al monocromador a través de una rendija; el monocromador tiene como elemento dispersante una rejilla de difracción. La luz monocromada que pasa a través de la rendija de salida del monocromador llega al detector y posteriormente esta señal se amplifica y se registra, dando como resultado un espectro (30,36).

Los componentes de un instrumento dispersivo se enlistan en la Tabla 3

(31,35,36).

| SISTEMA | COMPONENTES (Infrarrojo medio) |
|---------------------|---|
| Fuente de radiación | Filamento de Nernst, Fuente Gobar, Tira de Nicromo (níquel-cromo) |
| Sistema dispersivo | Rejilla de difracción con un monocromador de prisma o filtros infrarrojos |
| Detector | Termopar, Bolómetro, Detector Neumático de Golay |

TABLA 3. Instrumentación de un sistema dispersivo (31,35,36).

En los instrumentos no dispersivos no se usan prismas o rejillas. La radiación total de una fuente infrarroja se hace pasar a través de la muestra produciendo una mayor potencia de señal (36).

2.5.3.2. Instrumentos No Dispersivos (FTIR).

La Espectroscopia en el Infrarrojo con Transformadas de Fourier (FTIR) es hoy la técnica no dispersiva de preferencia sobre la espectroscopia IR dispersiva para manejar muestras cada vez más pequeñas y complejas. Su sensibilidad y resolución superan a los instrumentos dispersivos, su exactitud de longitud de onda absoluta, y la mayor precisión de las mediciones son algunas de las razones que están avalando su amplio uso ^(14,35,38).

Los componentes principales de un espectrofotómetro en el Infrarrojo con Transformadas de Fourier se encuentran en la Tabla 4 ^(29,31).

| SISTEMA | COMPONENTES |
|------------------------|--|
| Fuente de radiación | Filamento de Nernst, Fuente Global, Tira de Nicromo |
| Interferómetro | De Michelson o de Péndulo |
| Detector | De sulfato de triglicina deuterado, de mercurio-cadmio-telurio, de tartalato de litio. |
| Procesamiento de datos | Computadora |

TABLA 4. Instrumentación de un sistema no dispersivo ^(29,31).

En la Figura 5 se muestra un diagrama de un espectrofotómetro de infrarrojo no dispersivo son:

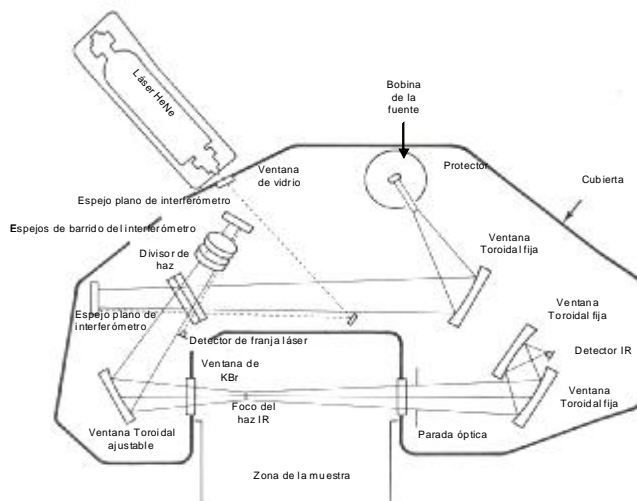


FIGURA 5. Espectrofotómetro no dispersivo (37).

a) Fuente de radiación. Este instrumento utiliza la misma fuente de radiación que un dispersivo.

b) Interferómetro. Existen de dos tipos:

-Interferómetro de Michelson. Es un sistema para dividir un haz de radiación en dos y luego volver a combinar los haces introduciendo una diferencia en su trayectoria. Este haz combinado pasa a través de la muestra y va hacia el detector. La división del haz se logra con un separador que transmite aproximadamente el 50% y refleja el otro 50%. Una parte del haz va hacia un espejo fijo y el otro a un espejo que puede moverse para introducir una diferencia de variación en la trayectoria obteniéndose un patrón de interferencia (29,31).

-Interferómetro de péndulo. El principio de funcionamiento es similar al anterior. La diferencia es que en lugar de que haya un desplazamiento lineal del espejo móvil (lo cual ocasiona incremento del ruido, error en los valores de transmitancia y pérdida de resolución) hay una rotación de cierto número de grados.

c) Detector. Normalmente se utilizan tres tipos de detectores:

-De Sulfato de Triglicina Deuterado (DTGS). Este detector es el más común. Consta de un dispositivo piroeléctrico operado a temperatura ambiente y tiene una respuesta más rápida que el termopar.

-De Mercurio-Cadmio-Telurio (MCT). Es un dispositivo fotoconductor que opera a la temperatura del nitrógeno líquido. Tiene mejor respuesta a frecuencias de modulación altas que el DTGS. Es recomendable para muestras opacas.

-De Tantalato de Litio (LiTaO). Es de bajo costo, opera a temperatura ambiente como el DTGS, pero es menos sensible que este.

d) Sistema de procesamiento de datos. Consiste de una computadora capaz de realizar las operaciones matemáticas de Transformadas de Fourier (29,30,31).

Básicamente, la técnica es un acoplamiento del interferómetro de Michelson con un detector infrarrojo sensible. En el interferómetro de Michelson no hay monocromador y la radiación de muchas frecuencias pasa a través de la muestra. En lugar de dispersar la radiación policromática como lo haría un espectrofotómetro dispersivo convencional, el espectrofotómetro de Transformadas de Fourier efectúa una transformación de frecuencia. No se requiere dispersión o filtros que desperdician energía, y esto representa una gran ventaja ^(14,36).

El Espectrofotómetro de infrarrojo con Transformadas de Fourier tiene una fuente luminosa que emite luz infrarroja policromática, la cual llega a un divisor de haz hecho normalmente de bromuro de potasio (KBr) o Yoduro de Cesio (CsI) colocado en una posición de 45° y con un pequeño recubrimiento de germanio en la parte posterior.

La función de este, es dividir el haz procedente de la fuente en dos partes iguales: la primera de ellas que refleja hacia un espejo fijo, colocado en la parte superior y cuya función es la de volver a reflejar este haz luminoso hacia el divisor de haz. El segundo haz no se refleja, sino que pasa a través del divisor de haz hacia un espejo que tiene un movimiento lineal el cual servirá para introducir una variable llamada diferencia de paso óptico. Los dos haces se combinan de nuevo en el divisor de haz interfiriéndose constructiva y destructivamente, dependiendo de la diferencia de paso óptico entre el divisor de haz y los espejos. La radiación recombinada pasa a través de la muestra hacia el detector.

En el trayecto del haz infrarrojo corre paralelamente un rayo láser de helio-neón que proporciona la exactitud en la frecuencia. La señal que se obtiene al final de este proceso es un interferograma, que por uso de las ecuaciones de Transformadas de Fourier y por medio de una computadora se convierte al final en un espectrograma ^(29,31,39).

La rapidez y la alta sensibilidad de la espectroscopia FTIR, que la hacen ideal para el microanálisis, se originan en varios factores. Primero, la calidad de un espectro de IR depende no sólo del número de elementos de resolución sino también de la relación entre señal y ruido; pero, desgraciadamente el aumento en el número de elementos de resolución se acompaña por lo general de una disminución en la relación entre señal y ruido, en consecuencia, la señal que llega al transductor es más débil, pero el ruido permanece constante ^(14,35,40).

Un espectrofotómetro de Infrarrojo con Transformadas de Fourier tiene varias ventajas sobre un instrumento dispersivo clásico ⁽³²⁾:

1. Ventaja múltiplex o de Fellget. En el espectrofotómetro dispersivo se miden sucesivamente todas las frecuencias, mientras que un espectrofotómetro de FTIR las mide en forma simultánea y en consecuencia se obtienen aumentos significativos en la relación señal-ruido. Esta propiedad es conocida como ventaja múltiplex o de Fellget, donde la alta relación señal-ruido se debe al hecho de que la muestra, y por lo tanto el detector, son afectados por todas las frecuencias a la misma vez. Más aún, si se desea mejorar dicha relación, el interferómetro permite efectuar exploraciones repetitivas (barridos) con señales

promediadas en tiempos más cortos que los empleados por un espectrofotómetro de dispersión para efectuar un barrido sencillo (14,31,35,36,37).

2. Ventaja de Jacquinot. Otro factor importante es el hecho de que, para la misma resolución, el poder de la radiación que pasa a través de un interferómetro es significativamente más grande (alrededor de 40 veces) que en un instrumento dispersivo donde está restringida por las rendijas. Por eso mismo, solo el 10% de la energía de la lámpara se aprovecha, mientras que en el FTIR el 95% es aprovechado. En combinación con la ventaja de Fellgett, se llega a una de las características más importantes del espectrofotómetro FTIR: la habilidad de lograr la misma relación señal-ruido de un instrumento dispersivo en un tiempo más corto (14,29,31).

3. Ventaja de Connes. La escala de frecuencias de un interferómetro se deriva de un rayo láser de helio-neón, que actúa como una frecuencia interna para cada barrido. La frecuencia de este láser se conoce con exactitud y es estable. Como resultado de esto, la calibración de frecuencia de los interferómetros es mucho más exacta (0.01 cm^{-1}) y tiene una mayor estabilidad que la de los instrumentos dispersivos.

4. Ventajas de Resolución. La resolución es constante en todas las longitudes de onda. En un instrumento dispersivo el poder de resolución es menor y además varía a causa del programa de rendijas. Otra característica importante es que en el FTIR, como no hay rejilla de difracción o cambios de filtros, no hay

discontinuidad en el espectro como la que se presenta con un sistema dispersivo donde si existen.

5. Velocidad. Otra ventaja importante es que debido a la alta velocidad de respuesta (segundos), éste se puede conectar a un cromatograma y el espectro infrarrojo de cada uno de los componentes pueden ser obtenido ^(29,31).

6. Ventajas de operación. La capacidad de memoria se puede ampliar para guardar desde 3 hasta miles de espectros. Puede hacer uno o más barridos de fondo (background). Puede hacer la diferencia de espectros que es de gran ayuda para el análisis cualitativo y cuantitativo ⁽²⁹⁾.

Hoy en día, la instrumentación infrarroja moderna permite obtener espectros de muestras disponibles sólo en pequeñas cantidades. Ninguna otra técnica concede el análisis de materiales bajo esta variedad de condiciones físicas (estado físico, cantidad de materia, etc.), y es esta versatilidad la que le confiere su desarrollo dentro del trabajo de la química analítica ⁽²⁷⁾.

2.5.4 Aplicaciones

La espectroscopia en el infrarrojo tiene fundamentalmente dos aplicaciones: el análisis CUALITATIVO y el CUANTITATIVO.

2.5.4.1 Análisis Cualitativo.

La principal utilidad de la espectroscopia en el infrarrojo ha sido la identificación de grupos funcionales en compuestos orgánicos, ya que los espectros correspondientes suelen tener numerosas señales de absorción que pueden servir para realizar la elucidación de una estructura química, la mayoría de las ocasiones comparado contra una muestra de referencia. Con excepción de los isómeros ópticos, no existen teóricamente dos compuestos que absorban exactamente igual y como consecuencia presenten el mismo espectro. Actualmente los instrumentos modernos cuentan con bibliotecas de espectros lo que facilita el trabajo analítico ⁽³⁵⁾.

Un compuesto desconocido, puede a menudo ser identificado al señalar la posición de las diferentes frecuencias de absorción y asociarlas con las cartas de correlación estructura-espectro, las cuales son un compendio de datos sobre los grupos funcionales más comunes y las señales de absorción características de cada uno de ellos que se presentan siempre, independientemente del compuesto químico en el que se encuentren. Con ellas, el investigador puede determinar la característica estructural de un compuesto desconocido y reducir así el número de posibilidades ⁽²²⁾.

De esta manera, para el análisis cualitativo se deben de observar tres características importantes de las bandas de un espectro: posición, forma e intensidad ^(14,37).

2.5.4.2 Análisis Cuantitativo.

Hoy en día, con la introducción de los instrumentos con Transformadas de Fourier, la espectrofotometría infrarroja se emplea cada vez más en el análisis cuantitativo. En este caso, su enorme ventaja reside en la selectividad que tiene, lo que posibilita la cuantificación de un componente en una mezcla compleja sin la separación de otras sustancias o productos de degradación del mismo compuesto presentes en la muestra (35,41,42,43).

En una serie de estándares de concentración conocida la intensidad de una señal de absorción a una misma longitud de onda es proporcional a la concentración del componente que la causa. Por ello, la cuantificación de un compuesto puede efectuarse por comparación de la intensidad de una señal característica de este, con las intensidades de la señal a esa misma frecuencia medidas a diferentes concentraciones del componente puro, para el análisis de mezclas lo único que se requiere es una señal de absorción para cada uno de los componentes, de intensidad apreciable y que no se sobreponga con la de otros en la muestra total (29,30).

El análisis cuantitativo infrarrojo se fundamenta en la ley de Lambert-Beer que se basa en la intensidad relativa de radiación que llega al detector o el porcentaje de transmisión de la radiación incidente al pasar por la muestra (29,35,36).

La Ley de Beer expresa, precisamente, la relación entre la cantidad de energía absorbida y su relación directa con la concentración del elemento a cuantificar: la absorbancia es directamente proporcional a la trayectoria de la radiación a través de la solución y a la concentración de la especie que produce la absorción.

Dependiendo de las unidades de medida, esta ley puede ser escrita de diversas formas ^(14,35,44):

$$A = ecl/P; = abc; = \text{long } I_0I; = -\log T; = \log 1/T; = \log 100/\%T$$

$$T = I/I_0$$

Donde:

A = absorbancia

c = concentración en gramos por litro.

l = b = grosor de la celda en cm.

a = e/P.M. = absortividad molar, es una constante de proporcionalidad y es característica del compuesto para esta absorción particular.

e = absortividad molar o coeficiente de extinción molar. Esta es una característica de la muestra en una frecuencia particular. Esta es casi la misma para un grupo de compuestos si la banda de absorción es característica de ese grupo.

I_0 = intensidad de la radiación incidente.

I = intensidad de radiación transmitida.

T = Transmitancia, es la razón de la energía transmitida y la energía incidente sobre la muestra.

El procedimiento para la cuantificación de un componente, es la medida de la absorbancia a diferentes concentraciones del compuesto puro ^(29,35,36,45).

Existe un método práctico para medir la absorbancia empleando la altura de las señales de absorción: el método de la línea base ^(35,36).

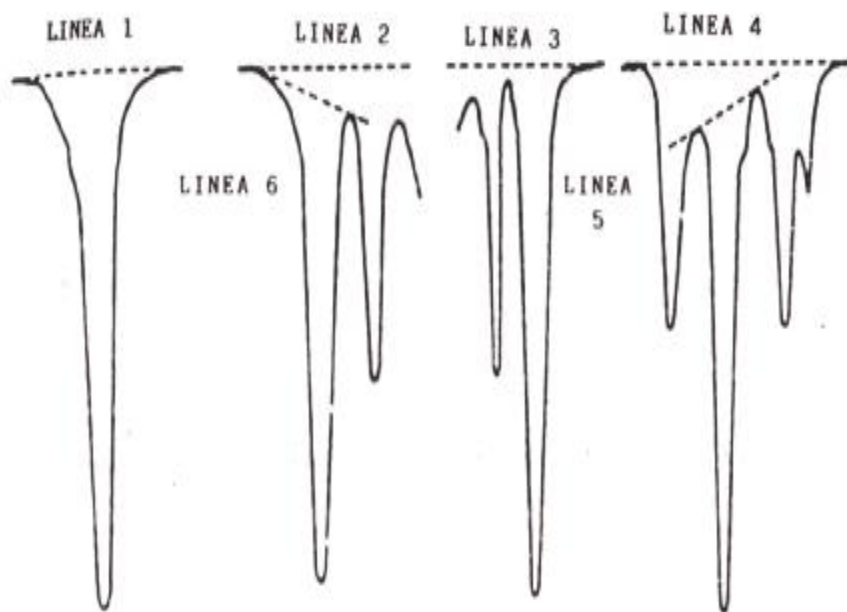


FIGURA 6. Formas de dibujar la línea base en una señal de absorción ⁽²⁹⁾.

Una vez elegida la señal, se dibuja una línea recta tangente a la curva de absorción espectral que representa la línea base de absorción de la muestra, para lo que se toman las siguientes consideraciones:

-Si no existen sustancias que interfieran, se dibuja la línea 1.

-Si está presente una sustancia extraña, cuya interferencia se encuentra del lado de mayor longitud de onda, se dibuja la línea 2. Si la interferencia se encuentra del lado de menor longitud de onda, se dibuja la línea 3.

-Si la banda perturbadora está cerca de la banda analítica, pero su efecto es esencialmente constante sobre el intervalo de análisis, se podría aplicar la línea 4.

-Cuando la transmitancia del disolvente es constante o al menos cambia linealmente entre los hombros de la banda analítica, se puede aplicar la línea 5 o la línea 6. Las desviaciones provienen de efectos instrumentales o químicos (29,35,36).

En un espectrofotómetro de infrarrojo, se puede leer directamente transmitancia o absorbancia (Figura 7).

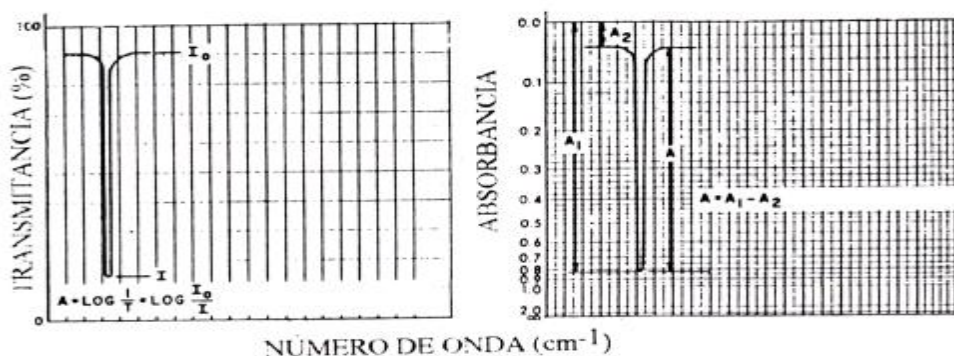


FIGURA 7. Maneras de medir la absorbancia en un espectro en el infrarrojo (36).

Una vez obtenidos los datos de absorbancia, estos se grafican como función de la concentración en un intervalo determinado de la misma para construir una curva de calibración. La absorbancia del compuesto problema se interpola en la curva de calibración para obtener la concentración desconocida (14,35).

Para el análisis cuantitativo en el infrarrojo, se utiliza la misma celda en todas las determinaciones.

Actualmente los métodos tritimétricos nos permiten comparar cuantitativamente el total de señales presentes en la muestra de referencia. Para el uso de estos métodos se requiere de un software sugerido por el fabricante.

2.6 Validación del método analítico

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, ya que es durante esta secuencia de pruebas y análisis, en donde el analista se da cuenta si el estudio o método, el cual está siendo evaluado sistemáticamente, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado ⁽⁴⁶⁾.

Todo método analítico tiene como propósito el determinar al analito en una muestra y es un procedimiento que involucra un proceso de medición que da como resultado una respuesta analítica. El atributo esencial que debe cumplir la respuesta es la "confiabilidad".

Toda respuesta analítica es influenciada por una serie de factores intrínsecos (variables operativas, eficiencia de técnicas extractivas, separativas, instrumentos, etc.), así como de factores extrínsecos del método (analistas, reactivos, materiales, etc.); lo que da lugar a que siempre este presente la variación.

Los factores intrínsecos, fijan la medida de posición de la respuesta y su análisis estadístico permite inferir respecto de la exactitud. Los factores extrínsecos, fijan la medida de dispersión de la respuesta analítica y el análisis estadístico proporciona inferencia respecto de la precisión. La medida de posición de la repuesta analítica se evalúa a través de la validación ⁽⁴⁷⁾.

La validación del método puede definirse como el proceso por el cual queda establecido que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa, en este caso, en términos de parámetros analíticos y debe estar debidamente documentada ^(1,46).

Esta actividad debe desarrollarse a través de estudios, ya sea por revisión de casos (validación retrospectiva) o por experimentación (validación prospectiva). Dichos estudios permiten establecer, con la ayuda de modelos estadísticos, si el atributo de la confiabilidad está ausente o presente, y están enfocados a la evaluación de ciertos parámetros analíticos reconocidos tanto a nivel nacional como internacional (especificidad, linealidad, exactitud, precisión, etc.). El propósito del método analítico debe ser establecido con claridad, ya que en función de éste se establecen los parámetros a evaluar ^(1,47,48).

DEFINICIONES, DETERMINACIONES Y CRITERIOS.

A. Especificidad.

Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra (excipientes, productos de degradación, disolventes, impurezas, etc.) ^(30,48).

B. Linealidad.

La linealidad de un sistema o método analítico representa su habilidad para asegurar que los resultados analíticos. Los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado. Con esta determinación se espera que dichos resultados se ajusten a una línea de respuesta expresada por la ecuación de la recta ^(46,49).

El modelo estadístico para la linealidad debe sugerir que se cumplan los siguientes requisitos ⁽⁴⁷⁾:

La relación entre X y Y en el intervalo de concentración estudiado, sea descrita mediante un modelo lineal:

$$Y = MX + B + Ea$$

Donde:

Y = respuesta analítica

X = concentración del analito

M = coeficiente que representa la magnitud de cambio de Y respecto de un cambio en X

B = respuesta de Y cuando se tiene ausencia en X

Ea = error aleatorio del sistema

Que además inicie en los valores $Y = 0$, $X = 0$; esto es, que pase por el origen en una gráfica de ejes cartesianos (X, Y) .

Para aquellos métodos en los que se emplea un estándar, una sola concentración o una curva de calibración, si el requisito no se cumple, la exactitud del método es afectada.

La variación de Y , es explicada por una variación en X , en el intervalo de concentración del analito estudiado.

La linealidad se debe evaluar tanto en el sistema como en el método ^(46,49).

Linealidad del Sistema. La determinación del analito en una muestra involucra en casi todos los métodos, el empleo de un sistema de medición, el sistema generalmente se basa en determinar la respuesta analítica ya sea física, química o biológica del analito; por ejemplo, en los sistemas espectrofotométricos se determina la radiación absorbida o transmitida por el analito.

Este parámetro se caracteriza por estudiar la relación concentración-respuesta en un intervalo apropiado de concentración únicamente del analito, sin incluir los otros componentes de la muestra. La exactitud de la respuesta analítica dependerá de que el sistema sea lineal, ya que el error aleatorio del sistema únicamente debe ser transmitido a la respuesta ^(30,47).

La linealidad del sistema, al igual que la precisión del sistema, deben realizarse antes que la linealidad del método; pues generalmente limitan a este último ^(48,49).

Linealidad del Método. Por su parte, el método también debe ser lineal pues así medirá sin error la cantidad de analito presente en una muestra no sólo a una cantidad constante, sino también a una cantidad variable; es decir, si la muestra contiene X cantidad de analito, el método debe medir Y cantidad de analito, donde $X = Y$.

Las concentraciones de los placebos adicionados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema, incluyendo siempre la correspondiente al 100%. La amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones del método y deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación ^(48,50).

C. Precisión.

Un requisito esencial de un método que tenga aplicaciones cuantitativas es la precisión, es decir, su capacidad para repetir y reproducir la medición ⁽⁴⁷⁾.

La precisión se define como el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una parte homogénea del producto. Este parámetro debe determinarse tanto al sistema como al método y usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación.

La precisión se establece en términos de 2 componentes independientes: la repetibilidad y la reproducibilidad ⁽⁵¹⁾.

La repetibilidad: Es la medida de la concordancia relativa entre determinaciones independiente del analito, bajo las mismas condiciones de análisis (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.), provenientes del muestreo de un material, en el cual el analito está distribuido de manera homogénea.

La reproducibilidad: Es la medida de la concordancia relativa, entre determinaciones independientes del analito, bajo distintas condiciones (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, etc.), provenientes del muestreo de un material, en donde el analito está distribuido de manera homogénea ^(46,51).

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación ^(46,49).

Debe distinguirse claramente entre precisión del método y precisión del sistema, entendiéndose la primera como aquella que se refiere a todo el procedimiento y la segunda como aquella que considera solamente la contribución del error atribuible al sistema operativo en si y no al error debido a la manipulación de la muestra.

Precisión del Sistema: Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100 por ciento establecido en la linealidad del sistema.

Precisión del Método (Reproducibilidad): Se determina de una muestra homogénea del producto cercana al 100 por ciento de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado (haciendo uso del método propuesto) ^(30,46,48).

D. Exactitud.

La exactitud es un atributo, el cual mide la concordancia absoluta entre el contenido del analito obtenido al aplicar el método a la muestra, y el valor verdadero del contenido del analito en la muestra. Obviamente, esta concordancia dependerá del error "in situ" del método analítico utilizado. Este

parámetro se expresa como el por ciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia (placebos adicionados), además de la desviación estándar porcentual (CV) de la medición (46,52).

La respuesta analítica de un método es influenciada por una serie de factores intrínsecos del método, por lo que se espera que estos factores gobiernen su exactitud.

Entre aquellos factores intrínsecos que pueden causar inexactitud del método se tienen: factores instrumentales (instrumentos mal calibrados, por ejemplo), factores del método (asociados principalmente a aspectos de diseño del método, como extracciones no cuantitativas, el uso de un indicador no adecuado, temperaturas inadecuadas, etc.) y, factores operativos (asociados principalmente a la experiencia del analista) (48,52).

E. Estabilidad de la muestra.

Este parámetro determina el periodo de tiempo en el cual se debe analizar una muestra, así como las condiciones específicas de almacenamiento que le permitan conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés durante ese tiempo. El periodo puede ser corto o prolongado dependiendo de los cambios observados en la muestra a lo largo del estudio (30,46,49).

F. Límite de detección.

Se define como la concentración mínima de un analito que puede ser detectada analíticamente pero no necesariamente cuantificada ^(46,53).

Esta definición incorpora consideraciones tanto del tamaño de la señal como del ruido de la línea base. También se define como la concentración que haga el cociente señal-ruido igual a tres.

El límite de detección describe la señal-ruido para el instrumento. Este término es de gran importancia analítica ya que describe la capacidad del instrumento y suministra una forma de estimar el valor mínimo de detección ^(30,50).

Siendo S_t el valor total medido para la muestra, S_b el valor del blanco y σ la desviación estándar medida. Puede ser demostrado que distribuciones normales $S_t - S_b > 0$ tienen un alto nivel de confiabilidad cercano al 99 por ciento cuando la diferencia $S_t - S_b > 3\sigma$. El valor recomendable del límite de detección es 3σ y el valor para S_b debe aproximarse a cero.

G. Límite de cuantificación.

Es la menor concentración de una sustancia en un muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas ^(46,53).

La certeza en la cuantificación del analito se incrementa en tanto que la señal del analito rebasa la señal del límite de detección.

El valor recomendable para el límite de cuantificación es de 10σ , con una incertidumbre del 30 por ciento en el valor medido ($10\sigma \pm 3\sigma$) con una certeza del 99 por ciento.

El límite de cuantificación sirve para definir el límite más bajo del rango útil para el método seleccionado. Este valor proporciona el límite de la linealidad, es decir, en donde la concentración del analito deja de ser proporcional a la respuesta medida.

Debe enfatizarse que el límite de cuantificación y de detección no son constantes intrínsecas en la metodología. Cada laboratorio debe evaluar su propia precisión y estimar sus propios valores de límite de cuantificación y detección ^(30,48).

3. Planteamiento del problema

Se describe en la literatura la determinación cualitativa y cuantitativa de la cocaína, métodos que requieren de tiempos relativamente largos y de una cantidad excesiva del producto. Además no se tiene en un mismo método la determinación cualitativa y cuantitativa.

Con base en lo anterior, la presente revisión bibliográfica propone un método analítico alternativo, por espectroscopía en el Infrarrojo con Transformadas de Fourier, obteniendo a la par el espectro (cualitativo) con la selección de la señal para la cuantificación de cocaína que optimice dicha determinación. Para garantizar que el método cumpla con las características para las cuales fué diseñado, y como parte fundamental del desarrollo de un nuevo método analítico, se revisa la validación del mismo método.

4. Objetivos

Objetivo general: Realizar la revisión bibliográfica de un método analítico para la cuantificación de cocaína en polvo, por Espectroscopia en Infrarrojo con Transformadas de Fourier (FTIR), así como la validación del mismo método.

Objetivos específicos:

- Realizar la revisión bibliográfica de la determinación cualitativa y cuantitativa de la cocaína en polvo.
- Determinar bibliográficamente el método analítico para la cuantificación de cocaína por Espectroscopia en Infrarrojo con Transformadas de Fourier.
- Examinar los parámetros de validación del método analítico, mediante la revisión bibliográfica.

5. Método

5.1 Material

- Matraces volumétricos de 10, 25, 50 y 100 mL, Pyrex.
- Vasos precipitados de 50, 100 y 150 mL, Pyrex.
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 5 y 10 mL, Pyrex.
- Pipetas Pasteur.
- Jeringas de vidrio.
- Mortero de ágata con pistilo.
- Embudo de tallo corto, Pyrex.
- Papel filtro de poro mediano.
- Pizeta de plástico.

5.2 Equipo e instrumentos

- Espectrofotómetro de Infrarrojo con Transformadas de Fourier (FTIR), Perkin Elmer 1600
- Celdas de Bromuro de Potasio.
- Balanza analítica, Bosch S-2000.
- Parrilla de calentamiento, Barnstead/Thermolyne.
- Refrigerador, General Electric.

5.3 Reactivos

- Cloroformo grado espectroscópico, J. T. Baker.
- Sustancia de referencia: Cocaína.
- Muestra de la supuesta droga de abuso (cocaína).

5.4 Procedimiento

Ensayo de identidad: Preparar una solución de referencia en cloroformo. Generalmente se obtienen buenos resultados con concentraciones de 1 a 10 por ciento m/v empleando una celda de un espesor de 0.05 mm a 0.1 mm. Llenar por separado la celda con la preparación de referencia y con preparación de la muestra evitando que queden burbujas y emplear para el blanco el mismo disolvente usado en la preparación de las soluciones.

Registrar en el instrumento la absorción de fondo seleccionando el número de barridos adecuados, para muestras en solución registrar la solución de fondo correspondiente al aire más la celda que contiene al disolvente. Colocar la celda que contiene la solución de referencia en el soporte para la celda y dentro del instrumento en la zona para la muestra, proceder a registrar el espectro de absorción entre 4000 cm^{-1} y 400 cm^{-1} (2.5 micras a 15 micras). Posteriormente, registrar el espectro de absorción de la muestra, en las mismas condiciones.

Se elige una señal de absorción adecuada tomando en cuenta las consideraciones propuestas por el método de la línea base, siendo la mejor definida, reproducible y que cumpla con la ley de Berr-Lambert.

Ensayos de cuantificación: Ajustar el instrumento como se indica en los ensayos de identidad. Preparar las soluciones de referencia con concentración de 1, 2, 4, 8, 10 por ciento en cloroformo, llenar una celda de absorción en el infrarrojo, con cada una de las soluciones de referencia, evitando que queden burbujas y registrar su espectro de absorción en Absorbancia, en el rango de longitud de onda. Tan rápidamente como sea posible usando la misma celda y las mismas condiciones de prueba, registrar el espectro de absorción de la solución de la muestra.

Se registra el espectro en transmitancia para un análisis cualitativo y en absorbancia para un análisis cuantitativo. La señal más intensa deberá estar preferentemente entre 5.0 por ciento y 80 por ciento para transmitancia, para absorbancia entre 0.2000 y 0.8000 ⁽³⁷⁾.

Cálculos: Marcar la línea base a través de la base de la señal de interés en el espectro obtenido con la solución de referencia y obtener el valor de absorbancia por la señal seleccionada. De la misma forma se procede con el espectro de la muestra. Con las lecturas que se obtengan en absorbancia para las preparaciones de referencia, construir una curva de calibración e interpolar el valor obtenido para la muestra de referencia.

Determinaciones analíticas

A). Especificidad

Se determinará la identificación al principio activo, en la sustancia de referencia, así como la identificación en la supuesta droga (30,46,47).

B). Linealidad del sistema y del método

Sistema: Se construye una curva de calibración de una misma solución patrón utilizando cinco niveles de concentración, en donde la muestra tres o intermedia sea la del 100 por ciento, y realizando el análisis por duplicado.

Método: Se determina con muestras adicionados del principio activo (referencia), cada uno de manera independiente, de tres concentraciones diferentes (tres de las mismas concentraciones elegidas para el sistema), haciendo los análisis por triplicado, por un mismo analista en las mismas condiciones de operación (46,47,49).

C). Precisión del sistema

Se determina en un análisis por sextuplicado de una preparación de referencia correspondiente al 100 por ciento (46,49,51).

D). Exactitud y Repetibilidad

Se realiza de manera independiente, en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista, seis muestras adicionados con el 100 por ciento de principio activo (46,48,51).

E). Reproducibilidad

Se lleva acabo con muestras por triplicado, por dos analistas y en dos días diferentes. Se trabaja de manera independiente, con una muestra homogénea del producto a una concentración del 100 por ciento de la preparación de referencia (30,46,51).

F). Estabilidad de la muestra

Se determina mediante la comparación de los resultados obtenidos de los análisis iniciales de tres muestras, con los resultados de las mismas muestras después de permanecer 24 y 48 horas en condiciones diferentes de temperatura (T.A. y refrigeración, ± 5 °C) y en diferentes envases de vidrio (ámbar y transparente). Se realizan bajo las mismas condiciones de operación, usando una solución de referencia recién preparada para cada tiempo de acuerdo a lo establecido en el método analítico (30,46,48,49).

6. Conclusiones

La revisión bibliográfica de los procedimientos para la realización de un análisis cualitativo y cuantitativo son muy similares y se pueden trabajar a la par, por lo tanto un método de cuantificación de cocaína en polvo por FTIR proporciona un ahorro en tiempo y costo.

La revisión bibliográfica de la Espectroscopia en el Infrarrojo con Transformadas de Fourier y su aplicación en el análisis cuantitativo nos muestra que tiene mucha importancia y sus ventajas son:

- Es rápido.
- Es un método accesible.
- No requiere de cálculos adicionales complejos.
- Es específico y exacto.
- La muestra de análisis se puede recuperar.
- Es un método no destructivo.

Todos los aspectos anteriores permiten que esta técnica de análisis instrumental tenga muchas áreas de aplicación como método cualitativo y cuantitativo.

Análisis cualitativo y cuantitativo de cocaína en polvo por FTIR

Dentro del área legal o legista de drogas nos proporciona rapidez y precisión para la entrega de los dictámenes.

7. Referencias Bibliográficas

1. Lual. (1993). COMPONENTES PARA UN PROGRAMA DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS, *Pharma News*, 4 (5): 39-40.
2. Cooper M. S. (1972). QUALITYCONTROL IN THE PHARMACEUTICAL INDUSTRY, U.S.A., Academic Press, pp. 155-156, 179, 181.
3. Koenig J. L. (1994). INDUSTRIAL PROBLEM SOLVING WITH MOLECULAR SPECTROSCOPY, *Anal. Chem.* 66(9), 515A-521A.
4. Florey K., Muhtadi F. J., Al-badr A. A., Brewer G.A., Brenner G. S., DeAngelis N. J., Mollica J. A. (1986). ANALYTICAL PROFILES OF DRUG SUBSTANCES. Vol. 15, Inc. Academic Press, London, pp. 151-221.
5. Bush L. (2005). THE END OF PROCESS VALIDATION AS WE KNOW IT?, *Pharmaceutical Technology* 29(8):36-41.
6. Brailowsky S. (1995). LAS SUSTANCIAS DE LOS SUEÑOS, NEUROPSICOFARMACOLOGÍA. 2ª ed. Fondo de Cultura Económica, México, D.F., pp. 209-212, 222, 238, 247-252.
7. Colección penal 2001. (2001). COMPENDIO DE LEYES, REGLAMENTOS Y DISPOSICIONES LEGALES SOBRE MATERIA PENAL. Ediciones Delma, México, pp. 47-53.
8. www.jurisprudencia.gob.sv/explois/indice.asp?nBD=1&nItem=30199&nModo=1
9. Beauchaine J. P., Peterman J. W., Rosenthal R. J. (1988). APLICATIONS OF FT-IR/MICROSCOPY IN FORENSIC ANALYSIS, *Mikrochim. Acta (Wien)* 1, pp. 133-138.
10. www.quimicaforence.htm
11. Budavari S., O'Neil M. J., Smith A., Heckelman P. E., Kinneary J. F. (1996). THE MERCK INDEX AND ENCICLOPEDIA OF CHEMICAL, DRUGS

- AND BIOLOGICALS. 11th edition. Published by Merck & Co. U.S.A. 1989, pp. 2451.
12. Sax N. I., Lewis R. J.(1993). HAWLEY DICCIONARIO DE QUÍMICA Y DE PRODUCTOS QUÍMICOS. Ediciones Omega, Barcelona España, 1993, pp. 261.
 13. Moffat A. C., Jackson J. V., Moss M.S., Widdop B. (1986). CLARKE´S ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DRUGS IN PHARMACEUTICALS, BODY FLUIDS AND POST-MORTEM MATERIAL. 2a edition. The pharmaceutical press, London, pp. 27-29, 489-490.
 14. Genaro A. R., Medwick T., Hanson G. R., White H. S. (1990). REMINTON´S FARMACIA, Tomos I y II, 20^a edición Argentina, Editorial Médica Panamericana, pp. 558-559, 571-572, 718-731, 1539-1540, 1546-1547, 1667-1668.
 15. www.mind-surf.net/drogas/cocaina.htm
 16. Meyer F. H., Jawetz E., Golfien A. (1977). MANUAL DE FARMACOLOGÍA CLÍNICA. Editorial El Manual Moderno, 3er edición, México, pp. 51-61, 240-249, 334-335.
 17. Saferstien R. (1998). DRUGS IN CRIMINALISTICS AND INTRODUCTION TO FORENSIC. Sixth edition. Prentice Hal, pp. 253-284.
 18. Katzung B. G. (2001). BASIC & CLINICAL PHARMACOLOGY. 8th ed. Ed. Lange Medical Books/MacGraw-Hill, U.S.A., pp. 131-132, 436, 443, 537-539.
 19. Goth A., Vesell E. S. (1984). FARMACOLOGÍA MÉDICA, PRINCIPIOS Y CONCEPTOS. Ediciones Doyma, pp 297-298, 312, 369-373.
 20. Field Manual. LAW ENFORCEMENT INVESTIGATION. HEADQUARTERS DEPTO OF THE ARMY. Washington, DC, (1985), pp. 135-144.
 21. Featherstone R. M., Hidalgo J. (1963). FARMACOLOGÍA DEL SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO. Editorial La Prensa Médica Mexicana, México, pp. 73-74.

22. Villanueva E. C., Martínez A. P.: INVESTIGACIÓN TOXICOLÓGICA EN MEDICINA LEGAL. 4ª edición, Editorial Masson-Salvat, pp. 592-603, 607.
23. Jungreis E. (1985). SPOT TES ANALYSIS, CLINICAL, ENVIRONMENTAL, FORENSIC AND GEOCHEMICAL APLICATIONS. John Wiley & Sons, U.S.A., pp. 45, 76-80.
24. Masoud A. N. (1975). SYSTEMATIC IDENTIFICATION OF DRUGS OF ABUSE I:STOP TESTS, *J. Pharmaceutical Sciences* 64 (5), 841-844.
25. Pradeau D., Cohen Y., Gómez S. L. (1998). ANÁLISIS QUÍMICOS FARMACÉUTICOS DE MEDICAMENTOS. Editorial Limusa, Grupo Noriega Editores, México, pp. 981-995.
26. Wade L. G. (1993). QUÍMICA ORGÁNICA. 2ª ed. Prentice-hall Hispanoamericana, México, pp. 479-510, 879.
27. Putzing C. L., Luegers M. A. McKelvy M. L. (1993). INFRARED SPECTROSCOPY, *Anal. Chem.*, 66(12):26R-66R.
28. Price W.J. (1973). A CURSE IN THE PRINCIPLES AND PRACTICE OF INFRARED SPECTROSCOPY, 3a ed., England, Pye Unicam Ltd., pp. 1-2, 41-47, 56.
29. NOTAS PARA EL CURSO BÁSICO DE ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA, (1995).México, Perkin Elmer de México.
30. López T. J. (1996). DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NAPROXÉN EN TABLETAS POR ESPECTROSCOPÍA EN EL INFRARROJO, TESIS. FES-ZARAGOZA, UNAM.
31. Adams R. F., Hannah R. W., Pattacini S. C. (1973). INFRARED IDENTIFICATION OF SOME INGESTED DRUGS AT TOXIC LEVELS IN SERUM. Perkin Elmer, U.S.A.
32. Petruzzi J. M. (1981). 1981-82 LABGUIDE, NICOLET ANALYTICAL INSTRUMENTS, *Anal. Chem.*, 53(8):1589-1592.
33. Pecsok R. L., Shields L. D. (1977). MÉTODOS MODERNOS DE ANÁLISIS QUÍMICOS. Editorial Limusa, México, pp. 195-227.

34. www.radioinfrarojo.htm
35. Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A. (2001). PRINCIPIOS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL. 5ª ed. Editorial MacGraw-Hill, España, pp. 409-461.
36. Willard H. H., Merritt L. L., Dean J. A., Settle F. A. (1991). MÉTODOS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS. Grupo Editorial Iberoamérica. México, pp. 279-310.
37. FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS. 8ª edición, México, 2004. pp. 57-58, 417-422.
38. www.dexin.com.uy/productos/shimadzu/espectrofotometros/infrarojo.htm
39. Kuehl D. T., Griffiths P. R. (1980). MICROCOMPUTER-CONTROLLED INTERFACE BETWEEN A HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPH AND A DIFFUSE REFLECTANCE INFRARED FOURIER TRANSFORM SPECTROMETER, *Anal. Chem.*, 52(9):1394-1399.
40. Woodruff H. B., Smith G. M.: COMPUTER PROGRAM FOR THE ANALYSIS OF INFRARED SPECTRA, *Anal. Chem.*, 52(14):2321-2327 (1980).
41. Lefers J. B., Van Den Berg P. J. (1980). DETERMINATION OF NITROGEN OXIDES AND NITRIC ACID VAPOR BY INFRARED SPECTROMETRY, *Anal. Chem.*, 52(9):1424-1426.
42. Saperstein D.D. (1980). ANALYSIS OF THE GASEOUS COMPONENTS OF REACTIONS BY FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROMETRY, *Anal. Chem.*, 52(11):1565-1570.
43. www.pncta.com.mx/pages/pncta_investigaciones00a.asp
44. Cartensen J. T., Rhodes C.T. (1993). SAMPLINGIN BLENDING VALIDATION, *Drug Development And Industrial Pharmacy*, 19(20), 2699-2708.
45. www.espectroscopiadeinfrarojo.htm
46. García M. A., Soberón E., Cortes M., Rodríguez R. (2002). GÍA DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANLÍTICOS, COLEGIO NACIONAL DE QUÍMICOS FARMACÉUTICOS BIÓLOGOS, México.

47. Lual. (1993). MODELOS ESTADISTICOS Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS (Primera parte), *Pharma News*, 4 (7):32-44.
48. Morales R. E. M. (1996). CUANTIFICACIÓN DE ACETATO DE PARAMETASONA POR ESPECTROSCOPÍA DE INFRERROJO CON TRANSFORMADAS DE FOURIER, TESIS. FES-ZARAGOZA, UNAM.
49. Inman E. L., Frischmann P. J., Winkel mG. D. (1987). GENERAL METHOD VALIDATION GUIDELINES FOR PHARMACEUTICAL SAMPLES, *J. Chrom. Sci.*, 25:252-256.
50. Lual. (1993). MODELOS ESTADISTICOS Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS (Tercera parte), *Pharma News*, 4 (10):16-19.
51. Lual. (1993). MODELOS ESTADISTICOS Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS (Cuarta parte), *Pharma News*, 4 (11):26-28.
52. Lual. (1993). MODELOS ESTADISTICOS Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS (Segunda parte), *Pharma News*, 4 (7):24-25.
53. Gans P., Gill J. B. (1980). COMMENTS ON CRITICAL EVALUATION OF CURVE FITTING IN INFRARED SPECTROMETRY, *Anal. Chem.*, 52(2):351-352.