



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

**“COMPARACIÓN DE UN MÉTODO POR ESPECTROFOTOMETRÍA  
UV CON UN MÉTODO POR INFRARROJO CERCANO, PARA LA  
CUANTIFICACIÓN DE CLONIXINATO DE LISINA EN UNA  
SOLUCIÓN INYECTABLE”.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACEÚTICA  
BIÓLOGA**

P R E S E N T A

**ERIKA ALINNE SANTANDER GARCÍA**

**ASESORES:**

**DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO**

**Q.F.B. JOSÉ ANTONIO GARDUÑO ROSAS**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Comparación de un Método por Espectrofotometría UV con un Método por Infrarrojo Cercano para la Cuantificación de clonixinato de Lisina en una Solución Inyectable.

que presenta la pasante: Erika Alinne Santander García  
con número de cuenta: 40302076-0 para obtener el título de :  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 29 de Julio de 2008.

PRESIDENTE	<u>Dra. Guadalupe Pérez Caballero</u>	
VOCAL	<u>Dra. Raquel López Arellano</u>	
SECRETARIO	<u>MC. Elvia Adriana Morales Hipólito</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB. Miriam Aidé Castillo Rodríguez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>QFB. Claudia Mariano Hernández</u>	

## AGRADECIMIENTOS

*A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas, por todo lo que he aprendido en ella y por permitirme cumplir mi gran meta.*

*A la Dra. Raquel López Arellano por el apoyo, y la confianza que me ha brindado para realizar este trabajo y por permitirme pertenecer al grupo de LEDEFAR.*

*Al QFB José Antonio Garduño Rosas por la ayuda y paciencia pero sobre todo por haberme compartido sus conocimientos para mejorar este trabajo.*

*A mis sinodales Dra. Guadalupe Pérez, MC. Elvira Adriana Morales, QFB. Miriam Aidé Castillo y MC. Claudia Mariano por dedicar parte de su tiempo para la revisión de este trabajo y darme sugerencias y comentarios, los cuales fueron de gran importancia para que este trabajo mejorara.*

*A la Q.F.B Guadalupe Álvarez por el apoyo y la gran ayuda que me brindó para realizar y terminar este trabajo, compartiéndome sus conocimientos.*

*A mis compañeros de LEDEFAR que hicieron de los días difíciles, momentos divertidos y sobre todo que me brindaron su amistad.*



**UNAM  
CUAUTILÁN**

## *DEDICATORIAS*

*A DIOS por permitirme llegar a esta etapa,  
por darme grandes dicha y bendiciones y  
por guiar mi camino, pero sobre todo por  
darme la gran familia que tengo.*

*A mis padres SOCO Y ANDRES por el gran  
esfuerzo que hicieron por darme una carrera  
profesional, pero sobre todo por darme su amor,  
comprensión y siempre estar cerca cuando los  
necesite. Ustedes son mi ejemplo y fuerza para  
seguir adelante... LOS AMO*

*A mis hermanos ILE, FER Y GER por su  
apoyo y amor, por estar en todo momento  
cerca de mí y más aún ser parte de este  
éxito, gracias por contar con ustedes...LOS  
AMO*

*A ti JULIO CESAR por apoyarme para realizar  
esta tesis, por permitir compartir tu tiempo e  
impulsarme a seguir adelante, y lo mas  
importante por darme tu amor... BB TE AMO*

*Nuestro quehacer en la vida no consiste en superar a otros  
sino en superarnos a nosotros mismos, romper nuestro  
propios records, sobrepasar nuestro pasado con nuestro  
presente.*

*Srewart Johnson*

# ÍNDICE

<b>I. Introducción</b>	1
<b>II. Objetivos</b>	3
<b>III. Generalidades</b>	4
1. Espectrofotometría de absorción	4
2. Espectrofotometría ultravioleta y visible	
2.1. Fundamentos de la espectrofotometría UV	5
2.2. Análisis cuantitativo: Ley de Lambert y Beer	8
2.3. Aplicaciones de la espectrofotometría UV	9
3. Espectrofotometría infrarrojo cercano	10
3.1. Fundamentos de espectrofotometría infrarrojo cercano	11
3.2. El modelo mecánico clásico para una molécula diatómica: Oscilador armónico -anarmónico.	12
3.3. Modos de registro en el NIR	13
3.4. Aplicaciones de NIR	16
3.5. Quimiometría	17
4. Validación de un método analítico	25
4.1. Definición de validación	25
4.2. Justificación de la validación de métodos analíticos	25
4.3. Términos relacionados con la validación	25
4.4. Tipos de validación	26
4.5. Estrategias de validación	27
4.6. Validación de métodos de análisis en la industria farmacéutica.	28
4.6.1 Prueba de adecuabilidad del sistema	29
4.6.2 Especificidad	29

4.6.3	Exactitud	30
4.6.4	Precisión	31
4.6.5	Limite de detección	32
4.6.6	Limite de cuantificación	33
4.6.7	Linealidad	33
4.6.8	Intervalo de concentración	34
4.6.9	Estabilidad de la muestra	34
4.6.10	Tolerancia	35
4.6.11	Robustez	35
5.	Clonixinato de lisina	
5.1	Características terapéuticas	36
5.2	Propiedades fisicoquímicas	37
<b>IV. Parte experimental</b>		
1.	Material e instrumentación empleado para la validación del método	38
2.	Método	39
2.1	Procedimiento general	39
2.2.	Desarrollo del método analítico por UV	40
2.3.	Validación del método analítico desarrollado por UV	41
2.4	Desarrollo del método analítico por infrarrojo cercano	42
2.5	Validación del modelo desarrollado por infrarrojo cercano	43
<b>V. Resultados y Análisis de Resultados</b>		
1.	Desarrollo del método analítico por UV	44
2.	Validación del método por UV	47
3.	Desarrollo del método analítico por NIR	62

3.1. Selección del conjunto de muestras de calibración.	65
3.2. Pretratamientos Espectral	66
3.3 Método de Calibración	67
4. Validación del modelo desarrollado por infrarrojo cercano	73
5. Comparación del método por Espectrofotométrica UV con el método por NIR	83
<b>VI. Conclusiones</b>	<b>87</b>
<b>VII. Referencias</b>	<b>89</b>
<b>Anexos</b>	<b>94</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS.

1. Propiedades de la radiación electromagnética	4
2. Espectro electromagnético	5
3. Transmisiones electrónicas permitidas	7
4. Comparación energética y de comportamiento molecular de UV e IR	10
5. Modos principales de vibración molecular.	12
6. Diagrama de energía potencial para un oscilador armónico y anarmónico	13
7. Diseño instrumentales en espectroscopia NIR	14
8. Reflectancia difusa	15
9. Espectros de soluciones de clonixinato de lisina en 4 diferentes medios	44
10. Comparación de los espectros de absorción de una solución estándar de clonixinato, placebo cargado al 100% y placebo	47
11. Gráfico de Respuesta Analítica (absorbancia) con respecto a la concentración de clonixinato de lisina obtenido para evaluar la linealidad del sistema	49
12. Gráfico de Concentración adicionada con respecto a la Concentración estimada para evaluar la linealidad del método	53
13. Comparativo de la variabilidad de porcentaje de recobro de Clonixinato de lisina entre día de análisis	60
14. Comparativo de la variabilidad de porcentaje de recobro de Clonixinato de lisina entre analistas	61
15. Gráfico de señal-ruido en función del número de barridos	62
16. Señal de ruido a 100 barridos	63
17. Espectros de absorción de las soluciones de Clonixinato de lisina por infrarrojo cercano	65
18. Espectro de las muestras aplicando la segunda derivada	66
19. Variabilidad de la muestras en tres ejes de PCs	67
20. Gráfico de valores de PRESS con respecto al número de factores	72
21. Gráfico de concentración adicionada contra la concentración calculada por el modelo	77

## ÍNDICE DE TABLAS.

1. División de la región infrarrojo cercano	10
2. Criterios para la clasificación de los métodos de calibración	19
3. Secuencia de una validación	26
4. Parámetros de desempeño que deben de evaluarse	28
5. Características fisicoquímicas del clonixinato de lisina	37
6. Intervalo de concentración para el método analítico	45
7. Concentración adicionada y la respuesta analítica (absorbancia) obtenida para evaluar la linealidad del sistema	48
8. Parámetros obtenidos del análisis de regresión de la linealidad del sistema	49
9. Análisis de varianza realizado para determinar la linealidad del sistema considerando un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ .	50
10. Respuesta analítica obtenida para evaluar la precisión del sistema	51
11. Concentración adicionada, y porcentaje de recuperación para evaluar la linealidad del método	52
12. Parámetros obtenidos del análisis de regresión de la linealidad del método	54
13. Análisis de varianza realizado para determinar la linealidad del método considerando un nivel de significancia de $\alpha=0.05$	55
14. Concentraciones adicionadas y los porcentajes de recobro obtenidos evaluar precisión y exactitud	56
15. Parámetros estadísticos para la precisión y exactitud del método	57
16. Parámetros estadísticos para determinar la precisión del método	57
17. Intervalos de confianza para evaluar exactitud del método	58
18. Resultados de la prueba de t de Student, evaluada para la exactitud del método considerando un nivel de significancia de $\alpha=0.05$	58
19. Coeficientes de variación de los porcentajes de recobro obtenidos para evaluar la repetibilidad y precisión intermedia del método (C.V.< 2%).	59
20. Análisis de varianza para evaluar la precisión intermedia, del método considerando un nivel de significancia de $\alpha=0.05$	60
21. Intervalo de concentración para el método analítico	63
22. Pretratamientos espectrales del método	69
23. Resultados de la variación de longitud de onda de corrección de línea base	70
24. Valor de PRESS para cada factor	72

25. Porcentaje de recuperación de una muestra para la repetibilidad del modelo.	74
26. Resultados de la prueba de t de Student, evaluada para la exactitud del método considerando un nivel de significancia de $\alpha=0.05$	75
27. Concentración adicionada, y porcentaje de recuperación para evaluar linealidad	76
28. Parámetros obtenidos del análisis de regresión de la linealidad del método	78
29. Análisis de varianza realizado para determinar la linealidad del método considerando un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ .	79
30. Coeficientes de variación de los porcentajes de recobro obtenidos para evaluar la precisión intermedia del método	80
31. Análisis de varianza para evaluar la reproducibilidad y repetitividad del método considerando un nivel de significancia de $\alpha=0.05$	81
32. Porcentajes de recobro % en dos días diferentes, por el mismo analista	82
33. Parámetros de desempeño a comparar de los dos métodos	83
34. Porcentaje de recobro de 3 muestras por UV y NIR	85

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	SIGNIFICADO
CL	Clonixinato de Lisina
NIR	Infrarrojo cercano
ICH	International Conference on Harmonisation
CNQFB	Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México
S.L.O	Selección de longitudes de onda
g	Gramos
mL	Mililitros
µg	Microgramos
Desvest	Desviación estándar
CV	Coeficiente de variación
λ	Longitud de onda
UV	Ultravioleta
gl	Grados de libertad
SC	Suma de cuadrados
CM	Cuadrados Medio (promedio de cuadrados)
F	Distribución de F
conc	Concentración
Cant ad	Cantidad adicionada
Cant rec	Cantidad recuperada
IC( $\beta_0$ )	Intervalo de confianza para la ordenada al origen
IC( $\beta_1$ )	Intervalo de confianza para la pendiente
IC( $\mu$ )	Intervalo de confianza para la media poblacional
$r^2$	Coeficiente de determinación
LSC	Limite superior de Confianza
LIC	Limite inferior de Confianza

## I. INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica necesita disponer de métodos analíticos, rápidos y fiables para monitorear de forma eficiente tanto para las materias primas como los productos terminados finales.

El objetivo de la presente tesis es el desarrollo de un método para la cuantificación de principio activo en solución de forma rápida y confiable. Para llevar a cabo este objetivo se han utilizado la espectroscopía UV-Visible y la espectroscopía de infrarrojo cercano.

La espectroscopía UV es un método farmacopeico poco usado en la industria farmacéutica, por su poco alcance en la cuantificación de componentes en matrices complejas, pero que tiene muchas ventajas en costos. Para principios activos no está reportado en farmacopeas, el primer método para cuantificarlo es por espectrofotometría de UV-Vis, este es el caso del clonixinato de lisina, que no es un activo farmacopeico, por ser relativamente nuevo.

La espectrofotometría de infrarrojo cercano resulta una técnica interesante debido a que proporciona información muy versátil de una forma rápida. Lo más interesante es que no destruye la muestra que se analiza en comparación con otras técnicas de análisis como, HPLC y espectrofotometría de UV, en las cuales es necesario hacer un tratamiento previo a la muestra, aunque esta última técnica representa uno de los métodos más baratos y rápidos de análisis.

La comparación de dos métodos (UV e infrarrojo cercano) nos ayudo a establecer el uso de NIRS como método alternativo para la cuantificación de líquidos, ya que un método relativamente nuevo y existen muy pocos experimentos en los que cuantifiquen principio activo en soluciones.

Para asegurar la confiabilidad de los resultados, los métodos analíticos se someten a un proceso de validación. Con esto se comprueba si el método es lo suficientemente confiable y si los resultados se obtienen dentro de las condiciones establecidas. La validación de los métodos analíticos se fundamenta en la determinación de diversos parámetros que se establecen de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan.

Para llevar a cabo las buenas prácticas de laboratorio, la validación es un requisito que está establecido por agencias regulatorias y por comisiones de Farmacopeas para el registro de nuevos medicamentos, el cual fue el propósito del desarrollo de este método.

## II. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Comparar un método desarrollado por espectroscopía UV contra un método en Infrarrojo cercano, para la cuantificación de Clonixinato de lisina en una solución inyectable, por medio de la capacidad predictiva de estos métodos en muestras de concentración conocida.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar las condiciones espectrofotométricas UV óptimas para la cuantificación del clonixinato de lisina
- Validar el método desarrollado para la cuantificación de Clonixinato de Lisina por espectrofotometría UV, evaluando especificidad, linealidad, precisión, exactitud y reproducibilidad adoptando los criterios de ICH y Guía de CQFB.
- Construir bibliotecas de espectros en NIR y desarrollar un método cuantitativo basado en PLSR (regresión parcial por mínimos cuadrados) para la determinación del principio activo en solución.
- Validar el modelo propuesto para la cuantificación de clonixinato de lisina por infrarrojo cercano, evaluando linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad y robustez
- Determinar si es posible cuantificar por infrarrojo cercano de forma confiable como método alternativo de cuantificación.

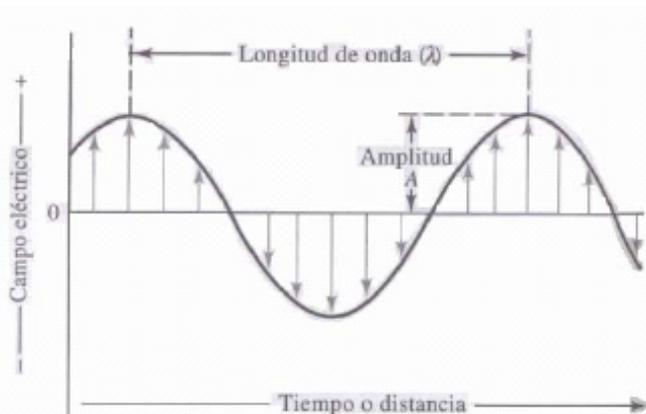
### III. GENERALIDADES

#### 1. Espectrofotometría de absorción

El término espectrofotometría se refiere al uso de la luz para medir las concentraciones de sustancias.

#### *RADIACION ELECTROMAGNÉTICA*

La espectroscopía estudia la interacción de la radiación con la materia. Las técnicas analíticas espectroscópicas miden la cantidad de radiación absorbida o emitida por las especies moleculares o atómicas. Dicha radiación electromagnética puede describirse como onda con propiedades de longitud, frecuencia, velocidad y amplitud etc, que se transmite en paquetes energéticos.



**Figura1** . Propiedades de la radiación electromagnética

El tiempo, medido en segundos, necesario para el paso de máximos o mínimos sucesivos por un punto fijo del espacio se llama periodo de radiación de una onda ( $p$ ). La frecuencia ( $\nu$ ) es el número de oscilaciones del vector del campo eléctrico por unidad de tiempo y equivale a  $1/p$ .

La velocidad de la onda está dada por el producto de la frecuencia y la longitud de onda. Dicha propiedad depende del medio y de la frecuencia de la onda, al vacío está es una constante. La longitud de onda ( $\lambda$ ) es la distancia entre máximos o mínimos sucesivos de una onda.

La amplitud de una onda electromagnética es una cantidad vectorial que mide la fuerza del campo eléctrico o electromagnético en un máximo de onda. [Harris, 1991]

Las regiones más importantes del espectro electromagnético se presentan en la figura 2.

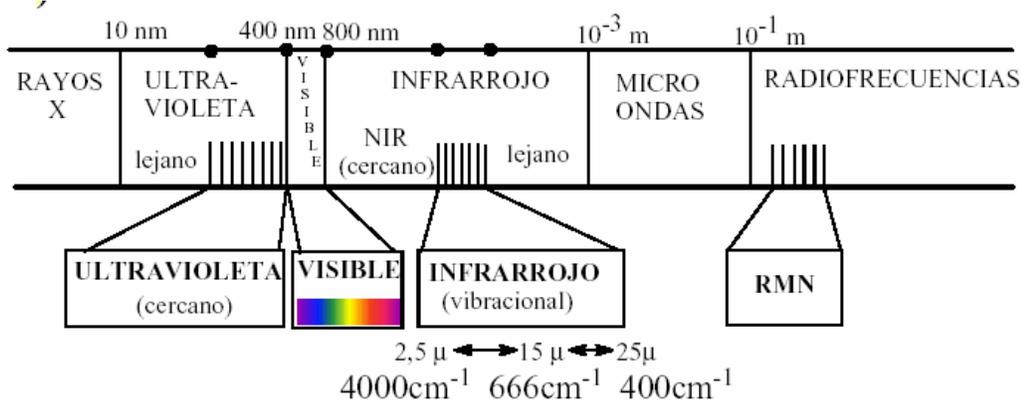


Figura.2 Espectro electromagnético.

## 2. Espectrofotometría ultravioleta y visible

### 2.1 Fundamentos de la espectrofotometría UV

La espectroscopía molecular está basada en la absorción de la radiación ultravioleta por los compuestos mayoritarios que forman la muestra, se emplea principalmente en el análisis cuantitativo.

La absorción de la radiación ultravioleta en las moléculas se presenta en forma de bandas anchas, obteniendo un espectro que incluye muchas líneas, las cuales representan una transición de un electrón en su estado fundamental a su estado electrónico excitado.

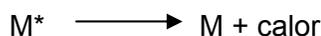
Como se muestra en la figura 2 la radiación ultravioleta se encuentra en las zonas del espectro electromagnético de los 10 a 400nm. Esta zona se divide en dos regiones: el ultravioleta cercano que abarca de 200 a 400nm y el ultravioleta lejano abarca de los 10 a 200nm. La espectroscopía de absorción molecular ultravioleta tiene su principal aplicación en la región de 200 a 400nm.

La medida de la absorción basada en la radiación ultravioleta o visible encuentra extensa aplicación en la determinación cuantitativa de especies moleculares e iónicas.

La absorción de la radiación ultravioleta o visible por especie atómica, molecular **M** o iónica se puede considerar que es un proceso en dos etapas, la primera de las cuales implica una excitación electrónica, como se observa a continuación



donde  $h$  es la constante de Planck ( $6.6260755 \times 10^{-34}$  J.s), mientras que  $\nu$  es la frecuencia de la radiación electromagnética, el producto de la reacción entre  $M$  y el fotón<sup>1</sup>  $h\nu$ , es una especie electrónicamente excitada que se presenta como  $M^*$ . El tiempo de vida de la especie excitada es breve de  $10^{-6}$  a  $10^{-9}$ s, su existencia acaba por alguno de los procesos de relajación. El tipo más común de relajación implica la conversión de la energía excitada en calor esto es:



La relación puede tener lugar también por descomposición de  $M^*$  dando nuevas especies: un proceso de este tipo se llama reacción fotoquímica. Alternativamente la relajación puede implicar reemisión de radiación fluorescente o fosforescente. La cantidad de energía térmica desprendida por la relajación es por lo general no detectable.

La absorción de la radiación ultravioleta o visible proviene de la excitación de los electrones enlazantes y como consecuencia, las longitudes de onda de los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlace que existen en las especies. La aplicación de la espectroscopía de absorción ultravioleta y visible son importantes para la determinación cuantitativa de compuestos orgánicos: cetonas, aminas, derivados nitrados, etc.

Muchos compuestos orgánicos absorben radiación directamente en la región ultravioleta; esta absorción se debe a transición electrónica de:

- a) Los electrones compartidos por varios átomos y que participan directamente en los enlaces ( $\pi$ )
- b) Los electrones no compartidos que se localizan principalmente en los heteroátomos de oxígeno, halógenos, azufre, nitrógeno ( $n$ ).

La longitud de onda a la cual absorbe una molécula orgánica, depende de la fuerza de unión de los enlaces. Los electrones que se comparten en enlaces sencillos ( $\sigma$ ) como carbono-carbono o carbono-hidrógeno, están unidos con tal fuerza que sólo es posible la absorción con

<sup>1</sup> La luz está constituida por partículas llamadas fotones, cada fotón tiene una energía  $E$  la cual está dada por  $E=h\nu$ .

fotones más energéticos que los del ultravioleta cercano. Los electrones que participan en dobles y triples enlaces ( $\pi$ ) están menos traslapados que los ( $\sigma$ ) por lo que la fuerza de unión es menor, y es más fácil excitarlos.

Los orbitales atómicos que forman los enlaces  $\pi$  en los compuestos orgánicos que tienen dobles ligaduras conjugadas están deslocalizados, se consideran que se encuentran en movimiento a través de la unidad química, por lo que interaccionan menos entre ellos y su energía de unión es menor.

La diferencia que existe entre los niveles energéticos de unión  $\sigma$  y  $\pi$  en sus respectivos niveles de antiunión  $\sigma^*$  y  $\pi^*$  coinciden con la energía que posee la radiación ultravioleta.

La absorción de la radiación electromagnética produce las transmisiones electrónicas entre los distintos niveles de energía. Las transiciones permitidas de acuerdo a los enlaces que absorben radiación son:  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ,  $n \rightarrow \sigma$ ,  $\pi \rightarrow \pi^*$  y  $n \rightarrow \pi^*$ .

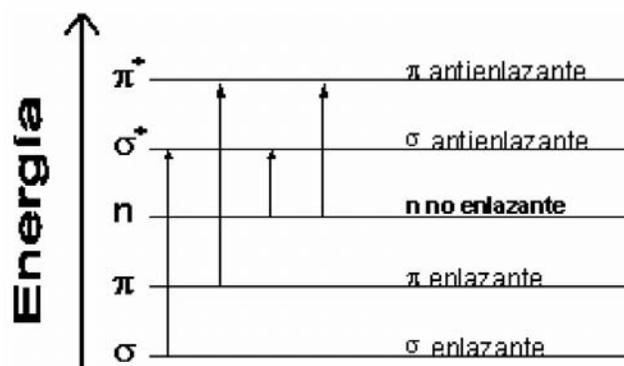


Figura 3. Transmisiones electrónicas permitidas.

Para la transición  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ , un electrón de un orbital  $\sigma$  absorbe radiación electromagnética y se excita pasando de un orbital  $\sigma$  de antienlace; requiriendo para llevar a cabo dicha transición una energía que corresponde a la frecuencia de la radiación de la región ultravioleta al vacío

La transición  $n \rightarrow \sigma^*$  se lleva a cabo cuando están presentes pares de electrones no compartidos o electrones no enlazantes ( $n$ ); éstos se excitan usando a un orbital de antienlace, requiriendo para llevar a cabo dicha transición una energía correspondiente a la frecuencia comprendida entre 150 y 250nm. Los máximos de absorción para estas transiciones se llegan a desplazar hacia longitudes de onda menores cuando se utilizan disolventes polares.

Las transiciones en las que intervienen los electrones pertenecientes a los orbitales  $\pi \rightarrow \pi^*$  y  $n \rightarrow \pi^*$  producen picos de absorción dentro de la región ultravioleta cercano, en la cual es factible trabajar experimentalmente. Las especies con enlaces insaturados absorben en esta región de espectro. Los máximos de absorción para las transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  se llegan a desplazar hacia longitudes de onda menores, con un efecto hipocrómico cuando se aumenta la polaridad del disolvente. En cambio máximos de absorción para las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  se desplazan hacia longitudes de onda mayores, con efecto batocrómico cuando se aumenta la polaridad del disolvente. [Harris, 1991]

## 2.2 Análisis Cuantitativo

### *Ley de Lamber y Beer*

Cuando un haz de luz pasa a través de una solución que absorbe radiación, parte del haz es absorbido.

Para poder llevar a cabo el análisis cuantitativo de un analito utilizando la ley de Lambert-Beer se tiene que construir una curva de calibración; que se realice con un material de referencia o con un reactivo de alta pureza del analito que se desea cuantificar, dicha curva requiere de la preparación de una serie de al menos cinco distribuciones provenientes de una disolución de concentración conocida (disolución madre). Se traza un gráfico de la respuesta (absorbancia) de las disoluciones en función de la concentración para el método de mínimos cuadrados se obtiene una línea recta que pase por los puntos de las intersecciones y una ecuación de dicha recta

El origen de esta ley se remonta a los trabajo del matemático francés Lambert que estableció en el siglo XVIII, las bases de la espectrofotometría igualmente Beer físico alemán del siglo XIX estableció la ley que permite calcular la radiación transmitida por un compuesto en disolución en una matriz no absorbente después de su paso a través de un determinado espesor, la expresión de la ecuación matemática de lambert-Beer es:

$$A = \epsilon l C$$

donde  $A$  representa la absorbancia, parámetro óptico adimensional registrado por el espectrofotómetro,  $l$  es el paso óptico de la radiación en centímetros,  $C$  es la concentración molar y  $\epsilon_\lambda$  es el coeficiente de absortividad molar cuyas unidades son  $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , a la longitud de

onda  $\lambda$  a la cual se realiza la medida del coeficiente absorptividad llamada también coeficiente de extinción, que es característico del compuesto analizado y depende de la temperatura y del disolvente. [Robinson; 1984]

Esta ley, que se refiere a la fracción de luz absorbida, cumple con las siguientes condiciones

- La radiación utilizada debe ser monocromática
- La concentración debe ser baja.
- La solución de los analitos no debe de ser fluorescente ni heterogénea
- El soluto no debe sufrir transformaciones fotoquímicas
- El soluto no debe originar asociaciones variables con el disolvente

Los espectrofotómetros son instrumentos espectroscópicos que permiten medir la relación entre la intensidad de energía inicial que se aplica a la muestra  $P_0$  y la intensidad de energía que ha pasado a través de la muestra  $P$ , lo que es necesario para medir la absorbancia del analito.

### **2.3 Aplicaciones de la espectrofotometría UV**

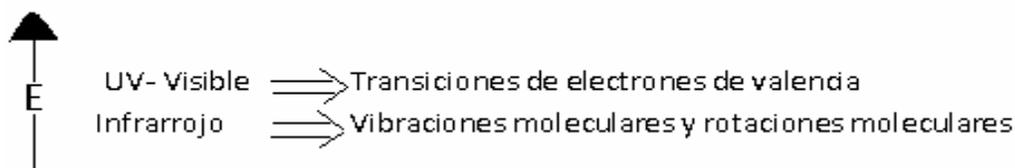
Como ya se mencionó la espectroscopía UV tiene su principal aplicación en el análisis cuantitativo. El aspecto cualitativo sólo detecta los grupos cromóforos presentes en las moléculas.

Entre las principales características de la técnica de espectroscopía UV son:

- Aplicabilidad, muchas especies tanto orgánicas como inorgánicas absorben la radiación UV.
- Alta sensibilidad, los límites de detección para la espectroscopía UV están en el intervalo de  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  M
- Selectividad de moderada a alta
- Buena precisión y exactitud
- Facilidad y comodidad, la espectroscopía UV es muy sencilla de manejar debido a los instrumentos modernos y la automatización de los equipos.

### 3. Espectroscopía infrarrojo cercano

La longitud de onda de la radiación infrarroja disminuye en el intervalo de  $25\mu$  a  $700\mu$ , puesto que la longitud de onda de la luz visible varía entre  $450\mu$  (luz violeta) y  $750\mu$  (luz roja), la radiación infrarroja es menos energética que la visible (figura 4) y más que la onda de radio. La radiación visible es el límite superior de la energía infrarrojo y el otro límite es a  $25\mu$ .



**Figura 4.** Comparación energética y de comportamiento molecular de UV e IR

La región infrarroja del espectro, está comprendida entre las longitudes de onda de  $700$  a  $10^6\text{nm}$ . Tanto por razones instrumentales, como por las características de la interacción de la radiación con la materia, se divide en tres zonas:

**Tabla 1.** División de la región infrarrojo cercana

Región	Longitud de onda (nm)	Origen de la absorción
NIR (Infrarrojo cercano)	700-2500	Sobretonos y bandas de combinación de vibraciones moleculares fundamentales
MIR (infrarrojo medio)	2500-50000	Vibraciones moleculares fundamentales
FIR (infrarrojo lejano)	50000- $10^6$	Rotaciones moleculares

La región NIR fue la primera zona del espectro de absorción no visible que se descubrió, pero el desarrollo y aplicación de métodos espectroscópicos en esta región para la resolución de problemas analíticos ha sido lenta.

Gracias a todos los avances tecnológicos el número de aplicaciones NIR en los diferentes campos ha crecido enormemente en los últimos años. Actualmente se pueden encontrar aplicaciones de la técnica en el análisis de alimentos, de productos farmacéuticos, de polímeros, entre otras.

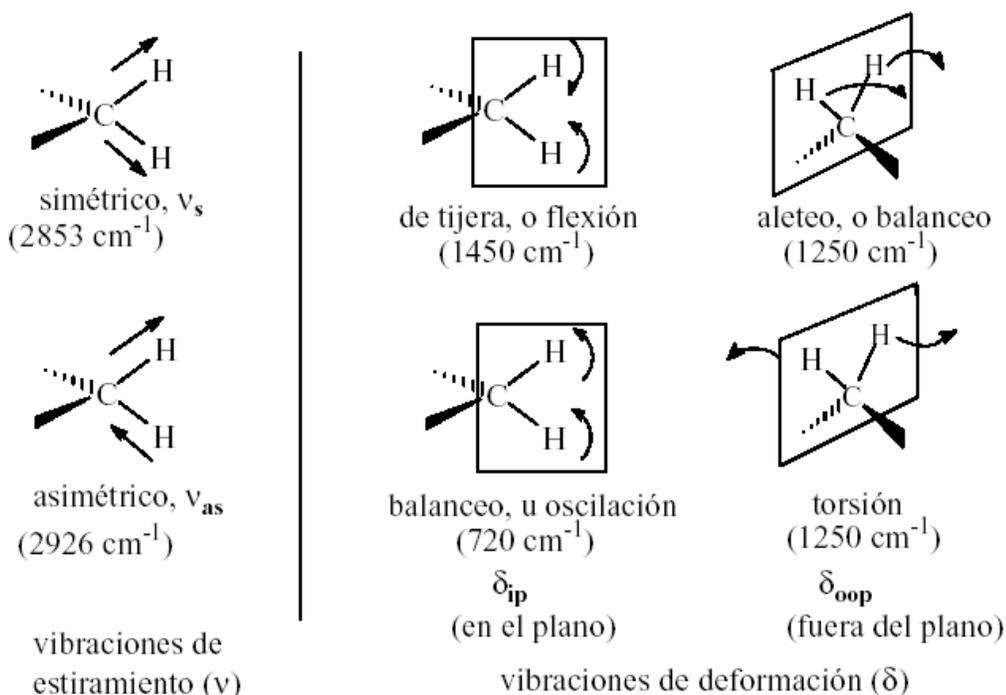
El gran interés que ha despertado la espectroscopía NIR en el sector industrial puede considerarse consecuencia directa de dos de las ventajas que ofrece como herramienta analítica para el control de calidad. Por un lado, la baja absortividad molar de las bandas de absorción permite trabajar en modo de reflectancia con la ventaja de poder registrar el espectro de muestras sólidas y líquidas sin necesidad de realizar tratamiento alguno, aumentando así el número y frecuencia de los análisis. Por otro lado, la doble dependencia de la señal con la naturaleza química y física de la muestra permite tanto su identificación como la determinación de parámetros químicos y físicos de la misma

### **3.1 Fundamentos de la espectroscopía infrarrojo cercano**

Para que una molécula absorba radiación electromagnética tienen que darse dos condiciones. Por un lado, la radiación debe tener la energía precisa para satisfacer los requerimientos energéticos del material. Por otro lado, debe producirse un acoplamiento entre la radiación y la materia. La radiación en el infrarrojo tiene la energía necesaria para provocar transiciones vibracionales en las moléculas y la primera condición para la absorción se satisface si una determinada frecuencia de radiación infrarroja corresponde exactamente a una frecuencia fundamental de vibración de una determinada molécula. Para satisfacer la segunda condición la absorción de la molécula, debe experimentar un cambio en el momento dipolar cuando tiene lugar la vibración fundamental o rotación. Si esto ocurre, el campo eléctrico asociado a la radiación puede interactuar con el campo eléctrico originado por la fluctuación del momento dipolar de la molécula.

Cuando se trata de especies homonucleadas como  $O_2$ ,  $N_2$  o  $Cl_2$  el momento dipolar no se altera durante la vibración o la rotación, y en consecuencia, este tipo de compuestos no absorben en el infrarrojo.

Las moléculas absorben radiación cuando alguna parte de ellas (es decir, los átomos o grupos de átomos que la forman vibran con una frecuencia igual de la radiación incidente. Después de la absorción las moléculas vibran con mayor velocidad. En la figura 5 se muestran los diferentes movimientos que pueden presentar moléculas complejas; las vibraciones pueden ser conjugadas, llevando a absorciones en el infrarrojo a frecuencias características que pueden relacionarse a grupos químicos.

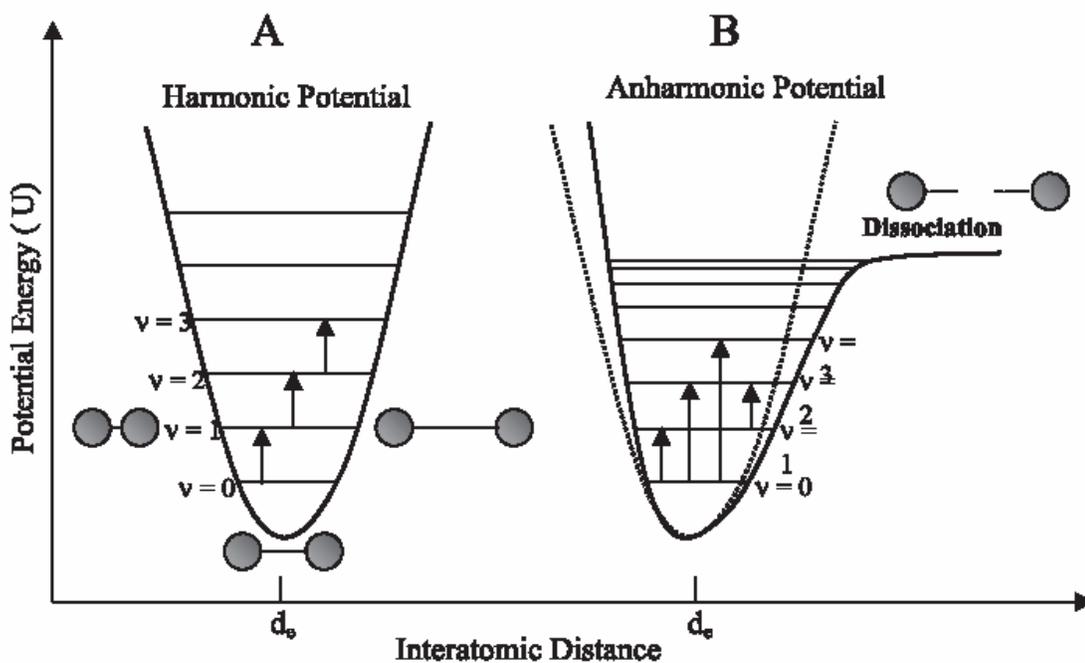


**Figura 5.** Modos principales de vibración molecular.

### 3.2 El modelo mecánico clásico para una molécula diatómica: Oscilador armónico-anarmónico.

Las características de vibración de una molécula diatómica pueden aproximarse a las de un oscilador armónico simple: dos masas unidas por un resorte, una de las cuales vibra a lo largo del eje de este resorte. Cuando dos átomos se aproximan, la repulsión coulombica entre los dos núcleos provoca un incremento más rápido de la energía potencial del que predice la aproximación armónica y cuando la distancia interatómica se aproxima a la distancia en la que tiene lugar la disociación, el nivel de energía potencial se estabiliza. Las moléculas tienen un comportamiento armónico sólo cuando la energía potencial es baja, es decir, en relación a la posición de equilibrio.

Para obtener una buena concordancia entre la teoría y la experiencia se añaden términos de corrección a la aproximación armónica que se denomina *correcciones de anarmonicidad* [Ciurczak, 1992]. Una consecuencia que se deduce del modelo oscilar no armónico es que no sólo es posible observar la banda fundamental, sino que también pueden ser observadas bandas correspondientes a transiciones, las cuales se denominan sobretonos y corresponden a parte de las bandas observadas en NIR. [Pasquini; 2003]

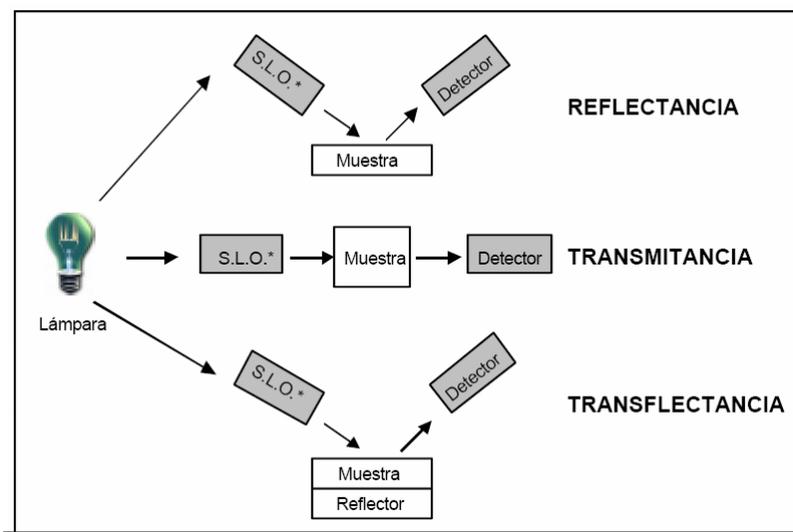


**Figura 6.** Diagrama de energía potencial de una molécula diatómica, para un oscilador armónico y anarmónico.

Aparte de los sobretonos, en la región NIR también aparecen las denominadas bandas de combinación, las cuales son debidas al cambio simultáneo en la energía de dos o más modos vibracionales. La intensidad de las bandas de combinación y los sobretonos dependen del grado de anarmonicidad del enlace. El hidrogeno, al ser más ligero de los átomos, vibra con una mayor amplitud en la vibración *stretching*. [ Ciurczak, 1992]

### 3.3 Modos de registro en el NIR

En el intervalo espectral del infrarrojo próximo se realizan medidas de reflectancia, transmitancia, o transfectancia. La diferencia básica entre los tres tipos de medidas son la posición de la muestra en el instrumento, como se muestra en la figura 7.



**Figura 7.** Diseño instrumental en espectroscopía NIR

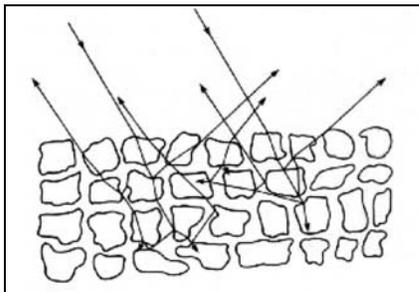
En todos los casos, la señal analítica que se obtiene en espectroscopía NIR es una función compleja, que habitualmente se expresa como absorbancia aparente ( $a = \log(I/R)$ ) o unidades de Kubelka-Munk cuando las medidas se realizan en modo de reflectancia, o como absorbancia ( $A = \log(1/T)$ ) cuando las medidas se realizan por transmisión.

### **MEDIDAS DE REFLECTANCIA DIFUSA.**

La espectroscopía de reflectancia estudia la radiación reflejada por la muestra, la cual puede ser especular o difusa.

- La reflectancia especular viene descrita por las leyes de Fresnel y predomina cuando el material sobre el que se produce la reflexión tiene valores altos de los coeficientes de absorción para la longitud de onda incidente; cuando la penetración de la radiación es muy pequeña en comparación con la longitud de onda y cuando las dimensiones de la superficie reflectante son mucho mayores que la longitud de onda
- La reflectancia difusa tiene lugar en todas las direcciones de la superficie como consecuencia de los procesos de absorción y dispersión (figura 8) y predomina cuando los materiales de la superficie reflectante son débilmente absorbentes a la longitud de

onda incidente y cuando la penetración de la radiación es grande en relación a la longitud de onda



**Figura 8.** Reflectancia difusa

La reflectancia difusa se explica por la teoría de Kubelka-Munk. Esta teoría asume que la radiación que incide en un medio dispersante sufre simultáneamente un proceso de absorción y dispersión, de forma que la radiación reflejada puede describirse en función de las constantes de absorción  $k$  y de la dispersión  $s$ . En el caso de muestras opacas y de espesor infinito, la función Kubelka-Munk se describe mediante [Burns; 2001]

$$f(R_{\infty}) = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2R_{\infty}} = \frac{k}{s} \quad (1)$$

Donde  $R_{\infty}$  es la reflectancia absoluta de la muestra, que es la fracción de radiación incidente que es reflejada.

En este caso la ecuación 1 puede escribirse en función de la concentración del analito absorbente ( $c$ ) como:

$$f(R_{\infty}) = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2R_{\infty}} = \frac{k}{s} = \frac{ac}{s} \quad (2)$$

Siendo  $a$  la absorptividad molar.

En la práctica, en vez de usar reflectancia absoluta  $R_{\infty}$ , se utiliza la reflectancia relativa  $R$  que es la relación entre las intensidades de luz reflejada por la muestra y por un estándar. El estándar es un material estable, con una elevada y relativamente constante reflectancia absoluta en el NIR, tal como el teflón, sulfato de bario, óxido de magnesio o placas cerámicas de alúmina de alta pureza.

Rescribiendo la ecuación de K-M en términos de reflectancia relativa se obtiene:

$$f(R) = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2R_{\infty}} = \frac{a\epsilon}{s} \quad (3)$$

Así para aquellas muestras que siguen esta relación, un gráfico de  $f(R)$  en función de la concentración es una línea recta con una pendiente de  $a/s$ . Sin embargo, si la matriz presenta absorción o si el analito tiene bandas de absorción intensas, la reflectancia difusa de las muestras no cumple con la ecuación de K-M y el gráfico de  $f(M)$  frente a la concentración no es lineal.

Se acepta que la ecuación de K-M como la ley de Beer, es una ecuación lineal que sólo puede aplicarse a bandas absorbentes de baja intensidad. Este supuesto se cumple en NIR, pero como no puede aislarse la absorción del analito de la absorción de la matriz (que frecuentemente absorbe fuertemente a la misma longitud de onda que el analito), se produce desviaciones de la ecuación.

### 3.4 Aplicaciones de NIRS

El uso de NIRS tiene una gran aplicación en los sectores agrícolas, textil, alimentos, de polímeros, farmacéuticos, petroquímico y mas recientemente en el diagnostico clínico. [Hayley; 1996].

- En el sector agrícola la espectroscopía infrarrojo cercano es aplicado para el análisis rápido de proteínas, humedad y contenido de lípidos en granos o semillas de soya.
- En la industria del alimento para animales puede ser utilizada para la gradación de calidad de la materia prima (por ejemplo, alfalfa), análisis de ingredientes para la formulación del alimento, y verificación de la calidad del producto final.
- En la industria de polímeros, en petroquímica para evaluación de algunos minerales.
- En la industria farmacéutica ha mostrado un especial uso, tanto para la identificación de grupos funcionales como para el análisis cuantitativo en control de calidad ( en identificación de materia primas, preparados de formas polimórficas y determinación de principios activos) y en el control de procesos (Homogenización de mezclas, seguimiento de procesos de *film coating*, seguimientos de reacciones y de conversiones polimórficas) .

### 3.5 Quimiometría

La señal producida por un instrumento de medida puede considerarse una señal “en bruto” que difícilmente podrá utilizarse de forma directa. En la mayor parte de los casos se trata de una magnitud física que resulta necesario correlacionar con la magnitud química de interés. La necesidad de tratar adecuadamente la información adquirida para extraer de ella lo más importante, ha llevado al desarrollo de nuevos procedimientos de una rama de la química analítica denominada quimiometría. Esta puede definirse como la parte de la química que, usando métodos matemáticos, estadísticos y de lógica formal, diseña o selecciona procedimientos de medida óptimos y proporciona la máxima información relevante de los datos analíticos.

La utilización de los métodos quimiométricos permite, entre otras cosas la identificación de muestras, el análisis de mezclas complejas sin necesidad de separaciones previas; la posibilidad de determinar simultáneamente varios analitos; aumentar la sensibilidad respecto a los métodos convencionales etc.

Para llevar a cabo un análisis, ya sea cualitativo o cuantitativo, es necesario establecer, previamente, modelos capaces de predecir propiedades desconocidas de nuevas muestras, de las cuales se ha determinado previamente la magnitud de la señal analítica.

El proceso de modelado de un conjunto de datos, ya sea para la clasificación o para la determinación cuantitativa de un parámetro determinado, tiene como finalidad obtener un modelo robusto capaz de predecir propiedades de nuevas muestras.

Para la obtención de un modelo robusto se deben seguir las siguientes etapas:

- a. **Selección del conjunto de calibración:** Seleccionar un conjunto limitado de muestras de las que se conozca la propiedad a determinar y que sea representativo de las muestras para las que se quiere realizar predicciones futuras.
- b. **Métodos de referencias.** Se determinan las concentraciones o propiedades de las muestras mediante métodos de referencia adecuados. Estos métodos de referencia deben de proporcionar valores precisos y exactos, ya que de ellos dependerá la exactitud del modelo multivariante obtenido.

c. **Obtención de la señal analítica.** Registrar la señal e introducir al sistema instrumental los datos del método de referencia; éstos son almacenados y quedan disponibles para su posterior tratamiento.

d. **Pretratamiento de los datos:** En esta etapa se minimizan posibles contribuciones no deseadas presentes en las señales denominadas comúnmente ruido, que disminuyen la reproducibilidad y que pueden provocar que el sistema presente ciertas características de no-linealidad que daría lugar a estimaciones menos sólidas. El ruido puede tener diferentes causas u orígenes; puede haber ruido debido a los componentes de la instrumentación utilizada para el registro, debido a variaciones de temperatura, humedad u otras condiciones ambientales, o bien a variaciones en la señal debidas a la propia naturaleza de la muestras.

A continuación se comentaran los pretratamientos espectrales más habituales en espectroscopía, aplicados con el fin de reducir o eliminar la contribución del ruido:

1. Promedio de espectros: el ruido de alta frecuencia es de naturaleza aleatoria, por lo que un promedio de varias señales de una misma muestra reduce la contribución del ruido aumentando la señal/ ruido. Es un procedimiento muy usual, siendo el espectro final el resultado de promediar un número determinado de espectros individuales.
2. Suavizado espectral: aplica en aquellos casos en los que el promedio de los espectros no es suficiente ya que la relación señal/ruido es pequeña. En este caso existen algunos algoritmos matemáticos que, aplicados al espectro reducen el ruido suavizando la señal. Los métodos de suavizado más habituales son los basados en filtros de Savitzky Golay y en transformadas de Fourier.
3. Corrección de línea base: Intenta corregir determinadas tendencias en la línea base que aportan ruido a la señal. Es usada para compensar el cambio espectral por sustracción de cada valor espectral en una longitud de onda específica. [Manual Foss Nirsystem].
4. Derivación: Es uno de los pretratamientos más utilizados en espectroscopía para minimizar desviaciones de línea base causados por efectos de dispersión. En espectroscopía NIR se utiliza para disminuir los problemas más característicos: solapamiento de bandas y variaciones de línea base. La utilización de la primera derivada elimina los términos constantes a todas las longitudes de onda, es decir,

desplazamiento de línea base, mientras que la segunda derivada corrige además las desviaciones causadas por los términos que varían linealmente con la longitud de onda. Generalmente no se utilizan derivadas de orden superior, puesto que la primera y segunda suelen ser suficientes. [Burns, 2001].

5. Variable normal estándar: o SNV es utilizado para la corrección de los efectos de tamaño de partícula en espectroscopía UV [Manual Foss Nirsystem]. Se aplica individualmente a cada espectro, sin depender de ningún espectro de referencia. De esta forma se obtiene una escala común a todos los espectros. [Pou, 2002]

e. **Construcción del modelo**: Selección del modelo que establece la relación entre la señal analítica y la variable respuesta deseada. El modelo puede tener una base totalmente empírica o bien soportada por una base teórica que explique el fenómeno físico o químico responsable de la señal analítica. La optimización del modelo se realiza ensayando distintos tratamientos matemáticos e intervalos de longitud de onda.

Los métodos de calibración pueden clasificarse de diferente manera, en función del criterio que se utilice; los más habituales se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2.** Criterios para la clasificación de los métodos de calibración.

Criterio	Método de calibración.	
Dependiendo del número de variables	Univariable	Relación matemática entre una única variable dependiente y una única variable independiente
	Multivariable	Intervienen más de una variable dependiente e independiente
Dependiendo del tipo de función matemático	Lineal	Relacionan las variables dependientes con funciones lineales de las variables independiente
	No lineal	Relacionan las variables dependientes con funciones no lineales de las variables independientes.
Dependiendo de la obtención de los parámetros de calibración	Directa	Cuando los parámetros de calibración se conocen directamente a partir de la señal de cada uno de los analitos de forma individual
	Indirecta	Cuando los parámetros se conocen a partir de las señales analíticas de mezclas de los componentes.

Dependiendo de cual es la variable independiente	Clásica	La variable independiente es la concentración y la variable dependiente la señal
	Inversa	La variable dependiente es la concentración y la variable independiente la señal

### 1. Regresión lineal múltiple (MLR).

El método fue introducido por Sternberg y colaboradores en 1960. Calcula una relación lineal entre la señal y la concentración aplicando el método de mínimos cuadrados<sup>2</sup> y se utiliza tanto en calibración clásica como en calibración inversa.

- *Regresión lineal múltiple clásica (CLS)*: Asume el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer para cada uno de los componentes de una mezcla en todo el intervalo de trabajo y la aditividad de las absorbancias en las muestras. La señal debida a una muestra es función de la concentración de cada componente por un coeficiente de proporcionalidad, de la forma expresada en la siguiente ecuación:

$$a_f = k_{f1} c_1 + k_{f2} c_2 + \dots + k_{fn} c_n + e_f \quad 3.1$$

Siendo esta ecuación válida para una muestra que contenga n componentes, donde  $e_f$  es el error aleatorio de la media,  $c_i$  es la concentración del componente i y  $k_{ij}$  es el coeficiente de proporcionalidad de cada muestra, igual al producto de absorptividad molar por el paso óptico. Si se registran K longitudes de onda  $K \geq n$ , se obtendrá un sistema de ecuaciones, que al ser resuelto dará las constantes de proporcionalidad de la ecuación.

Este es un método que utiliza el espectro completo, por lo que puede proporcionar mejoras frente a otros métodos en los que se trabaja con un número limitado de variables. [Haaland, 1980]

Sin embargo, para que este método pueda aplicarse a determinación simultánea de varios componentes, deben cumplirse las siguientes condiciones:

<sup>2</sup> Mínimos cuadrados es una técnica de optimización matemática que, dada una serie de mediciones, intenta encontrar una función que se aproxime a los datos (un "mejor ajuste"). Intenta minimizar la suma de cuadrados de las diferencias ordenadas (llamadas residuos) entre los puntos generados por la función y los correspondientes en los datos

- Se deben conocer todos los componentes que contribuyen a la señal analítica.
  - No se deben de producir interacciones químicas ni físicas entre los analitos, ni tampoco entre el analito y la matriz
  - El ruido debe de ser aleatorio en todo el intervalo de longitud de onda y con la menor magnitud posible.
- *Regresión lineal múltiple inversa*: (ILS, Inverse Least Square) asume una relación entre la absorbancia y la concentración que es inversa a la ley de Lambert-Beer. La concentración es función de la absorbancia a cada longitud de onda y se calcula multiplicando los valores de absorbancia por unos coeficientes de proporcionalidad.

$$y_i = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + \dots + b_{k-1} x_{k-1} + e_i \quad 3.2$$

Este método tiene la ventaja de que no es necesario conocer la concentración o la contribución de todas las especies absorbentes de la mezcla para la cuantificación de los analitos de interés. Sin embargo, los componentes no incluidos en la cuantificación deben estar presentes en todas las muestras y son modelados implícitamente.

La principal desventaja de este método es que el número de muestras debe de ser mayor que el número de variables. La selección de las variables es una cuestión compleja, ya que la utilización de un número demasiado elevado de variables puede provocar problemas de colinealidad (diferentes variables independientes aportan la misma información, ya que están altamente correlacionadas), disminuyendo así la precisión de los resultados.

## 2. Método basados en reducción de variables

Estos métodos se basan en que la información contenida en las variables de la señal pueden estar contenidas en un número menor de variables sin que haya pérdida de información relevante. El proceso de calibración se realiza, no sobre los datos originales, sino sobre estas nuevas variables, simplificando el modelo y la interpretación de los resultados.

Este tipo de métodos de calibración son de espectros completos, no presentan problemas de colinealidad ni las consecuencias derivadas de ella. Por estas razones, la tendencia actual es la utilización de métodos de calibración basados en una reducción de variables previa al cálculo del modelo.

- *Regresión en componentes principales (PCR)*: aprovecha las propiedades de la descomposición en componentes principales (PCA), realizando una regresión múltiple inversa (ILS) de la propiedad a determinar sobre las puntuaciones obtenidas en el PCA en lugar de realizarla sobre los datos originales. No existe pérdida de información útil, ya que las puntuaciones contienen la misma información que los datos originales pero habiendo eliminado el ruido.

Si tenemos en una muestra con un conjunto de  $P$  especies absorbentes, tendremos  $P$  variables  $y_1, y_2, y_3 \dots y_p$  representando la concentración de cada componente que pueden ser escrita en forma de vector  $\mathbf{y}$ . El espectro de la misma, registrado a  $K$  longitudes de onda constituye un conjunto de  $K$  variables independientes  $x_1, x_2, x_3 \dots x_k$  que pueden ser escritas en forma de vector  $\mathbf{x}$ . Si se construye un conjunto de calibración de  $M$  objetos, se puede agrupar los vectores que describen cada uno de ellos en dos matrices: la matriz  $\mathbf{Y}$ , que contiene las concentraciones de cada componente en cada muestra, de dimensiones  $(M \times P)$  y la matriz  $\mathbf{X}$ , que contiene los espectros de cada muestra, de dimensiones  $(M \times K)$ . De este modo, dentro de las matrices la información espectral o las propiedades a determinar de cada muestra están escritas en una fila, mientras que cada columna contiene la información de una variable concreta para todas las muestras presentes.

Uno de los principales problemas con PCR es que los componentes principales que mejor representan la matriz de los datos espectroscópicos,  $\mathbf{X}$ , pueden no ser los más apropiados para la predicción de las propiedades de los analitos que queremos determinar. Por este motivo se ha desarrollado otra técnica de calibración que intenta

concentrar el máximo poder predictivo en los primeros componentes principales. Este nuevo método es la regresión parcial por mínimos cuadrados.

- El método de Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados (PLS, *Partial Least-Squares Regression*) fue desarrollado por H. Wold en 1975. La principal diferencia con respecto a PCR radica en el hecho de que en PLS se intenta contener la mayor información para la producción de las muestras en los primeros componentes principales. Para ello durante la etapa de calibración, el algoritmo PLS utiliza tanto la información contenida en la matriz de datos espectroscópicos (Matriz X) como la información contenida en la matriz de la propiedad a determinar (matriz Y), obteniéndose unas variables auxiliares llamadas latentes, factores o componentes PLS.

Una vez centrada o autoescaladas las matrices X e Y, cada una de las matrices se descompone en una suma de A factores, calculando simultáneamente:

$$X = TP^t + E = \sum_{\alpha=1}^A t_{\alpha} P_{\alpha}^t + E \quad 3.3$$

$$Y = UQ^t + E = \sum_{\alpha=1}^A u_{\alpha} q_{\alpha}^t + F \quad 3.4$$

La ecuación (3.3) es la descomposición de la matriz de datos espectroscópicos X siendo T la matriz de puntuaciones, P la de cargas y E la matriz de residuales. En la ecuación 3.4, que es la descomposición de la matriz de la propiedad a determinar Y, U es la matriz de puntuaciones, Q la matriz de carga y F la matriz de residuales. Si tenemos M muestras, A factores, K variables y P analitos, la dimensionalidad de la matrices es la siguiente T y U (M x A), P<sup>t</sup> (A x K) y Q<sup>t</sup> (A x P). En este caso las de cargas no coinciden con las direcciones de máxima variabilidad de las muestras como es el caso de PCA, ya que están corregidos para poder obtener la máxima variabilidad de las muestras como en el caso de PCA. Ya que están corregidos para obtener la máxima capacidad predictiva para la matriz Y.

La descomposición de ambas matrices no es independiente, sino que se realiza de forma simultánea, estableciéndose una relación interna entre las puntuaciones de los bloques X e Y de forma que para cada componente se cumpla:

$$\hat{\mu}_a = b_a t_a$$

3.5

Donde el símbolo  $\hat{\mu}_a$  indica que es una cantidad calculada y  $b_a$  es el coeficiente de regresión para cada uno de los factores PLS. Si se desea calcular una única concentración de las presentes en la matriz Y, el algoritmo recibe el nombre de PLS1. El algoritmo PLS1 ha sido empleado en la calibración multivariantes de este trabajo.

- f. **Validación del modelo.** Aplicación del modelo establecido a un número de muestras de las que se conoce la propiedad a determinar, que no hayan sido utilizadas en la etapa de construcción del modelo. De esta manera se verifica que el modelo construido constituye una correcta descripción del conjunto de datos experimentales.
- g. **Predicción de nuevas muestras:** Utilización del modelo construido y validado para predecir la propiedad en muestras nuevas de las que se ha determinado previamente la magnitud de la señal analítica. [Porcel, 2001].

## **4. Validación de Métodos analíticos**

Cualquier método de análisis que se quiera utilizar para llevar a cabo el control de calidad de productos farmacéuticos y que no se trate de un método oficial, debe someterse a un proceso de validación para que pueda ser aceptado en análisis de rutina.

### **4.1. Definición de validación**

La validación es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada [Guía. CNQFB, 2002]

### **4.2. Justificación de la validación de métodos analíticos**

La validación de métodos analíticos puede tener problemas de tiempo y material por ser un proceso exhaustivo pero tiene grandes ventajas:

Demostrar que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas. La validación es la herramienta que permite obtener las pruebas documentadas al respecto

Trabajar con métodos que ofrezcan confiabilidad y seguridad en el resultado, lo cual a su vez minimiza el número de fallos y repeticiones, permitiendo un importante ahorro de costos.

Cumplir con las exigencias legales tanto de registro ante secretaria de salud y de las Buenas Prácticas de Laboratorio, con el fin de asegurar la calidad y eficiencia del producto.

### **4.3. Términos relacionados**

Validación, calificación y calibración son conceptos que suelen emplearse de forma indistinta; sin embargo, conceptualmente son diferentes:

- Validar es verificar y documentar que un método o proceso hace lo que tienen que hacer.
- Calificar es dotar o verificar las cualidades o características inherentes a un aparato.

- Calibrar es realizar el conjunto de operaciones que determinan la relación entre los valores indicados por el sistema de medición y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia. Por lo cual se puede decir que los métodos deben ser validados y los instrumentos calificados. En la Tabla 2 se observa la secuencia que se ha de llevar a cabo en la validación [Salazar,2001]

**Tabla 3.** Secuencia de una validación

NOMBRE	APLICACIÓN / REALIZACIÓN
CALIBRACIÓN	Instrumentos / Aparatos de medida
CALIFICACIÓN	Aparatos de control de máquinas Equipos
VALIDACIÓN	Procesos (Fabricación , análisis)

#### 4.4. Tipos de validación

En general se pueden considerar tres tipos de validación de métodos analíticos:

- Validación Prospectiva: para métodos nuevos
- Revalidación: repetición total o parcial de una validación para verificar que el método analítico continua siendo suficientemente fiable en el tiempo, o tras realizar modificaciones respecto al método inicial.
- Validación retrospectiva: para métodos repetidamente utilizados, no validados anteriormente y en los cuales se tiene documentación suficiente para probar que el método sirve para lo que fue desarrollado.

#### **4.4.1. Conocimientos previos a la validación**

- Tener perfectamente caracterizado el analito
- Trabajar con una formulación definida, puesto que los cambios en la composición, incluso a nivel de excipientes, afectarán probablemente al procedimiento analítico.
- Definir el procedimiento con todas sus condiciones necesarias para asegurar obtener los resultados deseados
- Tener todos los materiales y el equipo en perfectas condiciones para realizar la validación.

#### **4.5. Estrategia de validación**

La estrategia general de validación está formada de tres etapas:

1. Optimización de la metodología analítica: donde se conoce el sistema y pueden preverse los problemas del método desarrollado. A partir de las necesidades, objetivos del método y de la información recogida en esta etapa, se establecerán los límites de aceptación de cada uno de los parámetros.
2. Validación: consiste en el análisis de una serie de muestras a lo largo de varios días y por dos analistas, como mínimo. En esta etapa se analizarán muestras que van a permitir asegurar el buen funcionamiento del método
3. Análisis estadístico: del conjunto de datos generados se obtienen los parámetros analíticos de interés, tales como precisión, exactitud, linealidad, reproducibilidad, tolerancia. Los datos obtenidos a lo largo de la validación y el análisis estadístico permiten determinar los límites de confianza del método y establecer como se comportará en su aplicación rutinaria

#### 4.6. Validación de métodos de análisis en la industria farmacéutica.

Las guías oficiales que establecen la normatividad para llevar a cabo una validación son: United States Pharmacopeia (USP) International Conference on Harmonisation (ICH) y Food and Drug Administration (FDA). Sin embargo, la mayoría de estas guías están dirigidas a la validación de métodos cromatográficos, con lo que la validación de otros métodos se convierte en un proceso sin reglas preestablecidas.

En función de la aplicación analítica de un método, se indican los parámetros de desempeño a estudiar. En la tabla 4 se muestran las características que, según la guía ICH Q2A, deben de ser evaluadas

**Tabla 4.** Características que deben evaluarse

Características a evaluar	Identificación	Prueba de impurezas		Determinación de contenido
		Cuantitativo	Limites	
Exactitud	-	+	-	+
Precisión				
Repetitividad	-	+	-	+
Precisión intermedia	-	+ (1)	-	+ (1)
Especificidad (2)	+	+	+	+ (4)
Límite de detección	-	- (3)	+	-
Límite de cuantificación	-	+	-	-
Linealidad	-	+	-	+
Rango	-	+	-	+
Estabilidad de la muestra (5)	-	*	-	*
Robustez	-	*	*	+

- no evaluado habitualmente

+ evaluado habitualmente

(1) En caso en que se realice la reproducibilidad, no es necesario evaluar la precisión intermedia

(2) La falta de especificidad de un método puede ser compensada por otra alternativa analítica de soporte, como cromatografía de capa fina

(3) Puede ser necesario en algunos casos

(4) Un método que es exacto y lineal, por definición es específico al placebo analítico o a los otros componentes de la muestra.

\*Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método.

(5). También es definido como un estudio de tolerancia.

A continuación se realiza una descripción de cada uno de los parámetros:

#### *4.6.1. Prueba de Adecuabilidad*

La prueba de adecuabilidad del sistema consiste en un conjunto de ensayos que permiten comprobar, en el momento de utilizar el método, que el sistema (analista, reactivos e instrumento) es adecuado para llevar a cabo la determinación para la que se ha establecido y validado dicho método. Por tanto, esta prueba se ha de entender como parte integrante del procedimiento de análisis y requisitos previos a su realización. En la práctica podría equiparse a una “revalidación en continuo”, ya que proporciona la seguridad de que en el momento de iniciar el ensayo el conjunto del sistema continua siendo “válido” para el propósito para el que fue realizado.

#### *4.6.2. Especificidad*

Especificidad es la capacidad de un método analítico para medir y/o identificar de forma inequívoca el analito de interés, en presencia de otras sustancias químicas que pueden estar presentes en la muestra.

La presencia de interferencia pueden tener distintos efectos en la determinación del analito como imposibilitar su inequívoca identificación (aparición de falsos positivos) o distorsionar su respuesta.

La especificidad de un método analítico se determina antes de iniciar el estudio de cualquier otro parámetro de validación, dado que debe conocerse en que grado la respuesta del método es únicamente proporcionada por analito, sin interferencia de otras sustancias.

Dependiendo del objetivo del método analítico, los procedimientos necesarios para evaluar la selectividad son diferentes. ICH distingue dos categorías en la evaluación de la selectividad: identificación y métodos cuantitativos

En los métodos de identificación se demuestra que el método es capaz de discriminar entre el analito y sustancias con estructura muy similares que pueden estar presentes en la muestra. El proceso de discriminación puede confirmarse obteniéndose resultados positivos en el análisis de muestras que contienen el analito frente a resultados negativos en muestras que no lo contienen. Además, la prueba de identificación puede aplicarse a sustancias relacionadas

con el analito para confirmar que no se obtiene respuesta positiva. Las interferencias potenciales que deben de considerarse han de seleccionarse con criterio químico según el caso.

Los métodos cuantitativos, incluidas las pruebas de impurezas han de demostrar su selectividad, teniendo los componentes individuales bien caracterizados. Cuando se utiliza un ensayo selectivo, otros métodos de análisis pueden ser utilizados para demostrar la selectividad global

#### 4.6.3. Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado como valor verdadero o de referencia y el valor experimental encontrado.

La exactitud debe demostrarse en todo el intervalo de concentración especificado para el método analítico. Se recomienda un mínimo de 9 determinaciones sobre 3 niveles de concentración del analito (por ejemplo, 3 determinaciones por 3 niveles).

Matemáticamente la exactitud puede expresarse como porcentaje de recuperación del ensayo o como la diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero con sus intervalos de confianza.

Estadísticamente se suele efectuar un test t de Student para si el valor medido hallado y el valor considerado como verdadero no difieren significativamente para un grado de probabilidad determinado.

La desviación de la exactitud por exceso se produce cuando existen interferencias u la selectividad del método no es adecuada, obteniéndose resultados superiores al valor verdadero. En este caso, si es posible, se puede modificar las condiciones del método para optimizar la selectividad, o bien cambiar por otro método alternativo que sea más selectivo.

La desviación de la exactitud por defecto se produce cuando la matriz de la muestra es compleja y la extracción del analito requiere varios pasos, obteniéndose recuperaciones más bajas. Cuando esto ocurre es conveniente intentar optimizar la preparación de la muestra para mejorar el factor de recuperación. Si esto es muy costoso o no es posible, cuando la exactitud obtenida es repetible, es decir, tiene una precisión elevada y además es homogénea en todos

los niveles de concentración estudiados, puede aplicarse un factor de corrección<sup>3</sup> en el cálculo final para compensar las pérdidas del analito debidas al método de extracción.

#### 4.6.4. Precisión

La precisión expresa el grado de dispersión entre una serie de medidas que incorpora múltiples tomas de una misma muestra homogénea en las condiciones establecidas.

El objetivo del estudio de precisión es conocer la variabilidad del método de ensayo, pero sin tener en cuenta su proximidad con el valor real. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en la misma circunstancia, no conducen generalmente a resultados idénticos. Los factores susceptibles de influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo, instrumental, reactivos, tiempo etc) de aquí la importancia de dicho estudio.

Los resultados se expresan, generalmente en términos de coeficiente de variación (CV), desviación estándar e intervalo de confianza. El nivel de exigencia de los resultados dependerá del tipo de muestra y del método utilizado. Según la ICH, la precisión puede determinarse a tres niveles distintos: repetitividad, precisión intermedia y reproducibilidad.

- Repetitividad: expresa la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra bajo las mismas condiciones de operación (analista, instrumentos y reactivos) en un periodo de tiempo corto.

Puede ser estudiada siguiendo dos procedimientos

- ✓ Un mínimo de 6 determinaciones al 100% de la concentración nominal.
- ✓ Un mínimo de 9 determinaciones cubriendo el intervalo especificado del método ejemplo 3 réplicas a 3 niveles de concentración.
- Precisión intermedia. Expresa la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, pero en condiciones operativas diferentes (analista, día, instrumentos) en un mismo laboratorio.

---

<sup>3</sup> Factor de corrección: tratamiento matemático o valor numérico constante que se adiciona a los resultados obtenidos con el fin de obtener resultados finales exactos.

Por lo general la estimación de la precisión intermedia, se realiza con el cálculo del coeficiente de variación global de los resultados obtenidos, variando estos factores. Normalmente se aceptan valores del coeficiente de variación inferior al doble del coeficiente de variación de la repetitividad del método. En caso de que no se cumpla es necesario evaluar cuál es el factor responsable de esta variabilidad.

- Reproducibilidad. Expresa la variabilidad de los resultados inter-laboratorio y, por tanto, se considera como un estudio de precisión intermedia con el laboratorio como factor adicional. Este parámetro no es obligatorio y se debe realizar en aquellos casos en que se pretenda estandarizar el procedimiento analítico.
- 

#### 4.6.5. El límite de detección

El límite de detección (LD) se define como la mínima cantidad de analito que se puede detectar en la muestra, aunque no sea posible cuantificarla a ese nivel de concentración. Por tanto, es sólo un término cualitativo.

Para determinar el límite de detección pueden realizarse diferentes aproximaciones dependiendo de si el método es instrumental o no, utilizando protocolos basados en:

- Evaluación visual: la cual puede ser usada en métodos no instrumentales (cromatografía de capa fina o en valoraciones) y en métodos instrumentales.
- Relación señal/ruido, aplicable a métodos con línea base, como la espectrofotometría UV-Visible o la cromatografía líquidos o gases.
- Desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la recta de calibrado. Asimismo, los parámetros necesarios para estos cálculos pueden determinarse utilizando distintas vías.
- Desviación estándar del blanco: en la cual se mide la magnitud de la respuesta analítica de la solución blanco, realizado por un número de análisis apropiado de muestras blanco, se calcula la desviación estándar de esas repuestas.

Es necesario determinar el límite de detección en métodos de análisis destinados a la evaluación de impurezas mediante ensayos límite. Esto es, ensayos en los que simplemente se determina si la cantidad de impurezas presente en la muestra es superior o no al límite establecido en especificaciones, sin dar un valor numérico.

#### 4.6.6. Límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LC) es la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales normales, con una adecuada precisión y exactitud.

Para evaluarlo pueden utilizarse los mismos métodos que en el límite de detección aunque los parámetros de aceptación son ligeramente distintos

#### 4.6.7. Linealidad

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un intervalo de concentración establecido.

Si al observar el gráfico de la señal analítica en función del contenido de analito existe una relación lineal, los resultados pueden ser analizados mediante parámetros estadísticos, como la regresión lineal por mínimos cuadrados (coeficiente de correlación, ordenada en el origen, pendiente y error estándar relativo de la regresión). En caso que la respuesta analítica no sea lineal con la concentración, ésta debe describirse por una función adecuada.

Para evaluar la linealidad se recomienda un mínimo de cinco concentraciones, que cubran el intervalo de concentración del método, obtenidas directamente por dilución de una solución *stock* del analito o por pesadas independientes.

#### 4.6.8. Intervalo de concentración

El intervalo se define como el intervalo de concentración superior e inferior del analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito.

El intervalo de concentraciones mínimo que habitualmente debe especificarse dependerá del tipo de análisis. Para análisis cuantitativo, es de 80%-120% de la concentración, para la prueba de uniformidad de contenido es de 70% -130%, para prueba de disolución es de  $\pm 20\%$  el intervalo de concentración especificado.

#### 4.6.9. Estabilidad analítica de la muestra

La estabilidad analítica es una propiedad de la muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

El analista debe establecer la etapa de análisis en la cual se desea evaluar la estabilidad, además de determinar si en dicha etapa, es posible fraccionar (muestras dependientes) o no (muestras independientes) y las condiciones de almacenaje.

Para determinar la estabilidad analítica para muestras dependientes, el analista debe procesar hasta la etapa preestablecida por lo menos por triplicado una muestra homogénea. Fraccionar cada una de las preparaciones de acuerdo a las condiciones de almacenaje de interés. Terminar el análisis de una de las fracciones de cada preparado. Proseguir el análisis de cada una de las fracciones al término de cada condición de almacenaje, utilizando una solución de referencia recientemente preparada.

Para determinar la estabilidad analítica para muestras independientes, a partir de una muestra homogénea, el analista debe analizar por triplicado el contenido; simultáneamente y de la misma muestra procesar el número de muestras necesarias para cada condición de almacenaje hasta la etapa preestablecida (preparaciones) al menos por triplicado. Proseguir el análisis de cada una de las fracciones al término de cada condición de almacenaje, utilizando una solución de referencia recientemente preparada.

#### *4.6.10. Tolerancia*

Reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos, por el análisis de la misma muestra bajo condiciones normales de operación como puede ser: equipos, columnas etc. La robustez y la tolerancia son conceptos diferentes, ya que el primero se refiere a la influencia de factores internos del método mientras que la tolerancia, se refiere a factores externos del método.

Los parámetros que están relacionados con la tolerancia son la precisión intermedia y la estabilidad ya que cambian condiciones como analista, día, condiciones de análisis y almacenaje.

Se debe de establecer aquellos factores ajenos al método como diferentes equipos, lote de reactivos, columnas etc., que se puedan presentar al reproducir el método en otras condiciones de uso y analizar una misma muestra por lo menos por triplicado a cada condición.

#### *4.6.11. Robustez*

La robustez es la capacidad que demuestra el procedimiento de análisis para proporcionar resultados válidos en presencia de pequeños cambios respecto de las condiciones descritas en el método, susceptibles de producirse durante su utilización.

La guía ICH recomienda incluir la robustez en una fase apropiada del desarrollo del método y no en la validación propiamente dicha, dado que si la robustez del método no se comprueba con anterioridad a iniciar la validación, puede suceder que se intente validar un método poco robusto, con los consiguientes malos resultados y pérdida de tiempo y dinero.

Los parámetros a evaluar en cualquier método de análisis pueden ser tanto parámetros cuantitativos (influencia del valor de pH, del valor de la temperatura, porcentajes de componente orgánico en la fase móvil de cromatografía líquida) como cualitativos (fabricante de la columna cromatografía, un determinado reactivo).

En caso de determinar que hay parámetros que afectan al método de análisis, éstos deberán ser controlados y el método deberá incluir recomendaciones de cómo mantenerlos bajo control.

## **5. CLONIXINATO DE LISINA**

### **5.1 Características terapéuticas.**

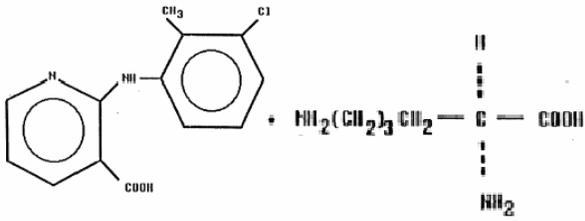
El Clonixinato de lisina es un fármaco analgésico antiinflamatorio no esteroideo soluble en agua. Está aprobado como analgésico para el tratamiento de dolor severo a moderado y como antiinflamatorio en eventos inflamatorios, como son la acción analgésica en el tratamiento de dolor post-episiotomía, dismenorrea, etc. Sin embargo, su mecanismo de acción aún no ha sido elucidado. Se sabe que es un inhibidor de potencia moderada de la ciclooxigenasa, lo que contribuye a su acción analgésica [Pineros, 2002].

Farmacocinética: El clonixinato de lisina se absorbe rápida y totalmente en el estómago, alcanzando concentraciones máximas séricas a la hora de su administración. No se deposita en la mucosa gástrica por ello tiene un mínimo índice ulcerogénico. Se distribuye ampliamente en los tejidos, no interviene con la coagulación a nivel plaquetario, por lo que no altera el tiempo de sangrado. Es metabolizado parcialmente a nivel hepático y se elimina por vía urinaria [Bautista, 1998].

## 5.2 Propiedades fisicoquímicas.

Las propiedades fisicoquímicas del clonixinato de lisina, se encuentran reportadas en la tabla 5.

**Tabla 5.** Características fisicoquímicas del clonixinato de lisina

Número de registro CAS.	CAS 55837-30-4 <sup>4</sup>
Nombre químico	4-Cloro-N-(2,6-dimetilpiperidina)-3-sulfamoylbenzamida sal de lisina <sup>5</sup> Sal de L-lisina 2-[(3-cloro-2-metilfenil)amino]-3-piridina ácido carboxílico Lisina 2-(2-metil-3-cloro-anilina)-3 nicotinato
Fórmula empírica	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>4</sub>
Fórmula estructural	 <p>[ Pineros,2002]</p>
Peso molecular	408.88g/mol
Solubilidad	Prácticamente insoluble en acetona, tolueno y cloroformo, ligeramente soluble en metanol y etanol, soluble en agua y soluciones alcalinas diluidas.
pKas	1.69, 4.8 <sup>6</sup>
Conservación	En recipientes cerrados, almacenar a temperaturas que no excedan 15°C (El refrigerador puede ser utilizado)

<sup>4</sup> Patente USP 3,973,027

<sup>5</sup> BAUTISTA, M.H. (1998). "Desarrollo y validación de la metodología analítica para la cuantificación de clonixinato de lisina en diferentes formas farmacéuticas". UNAM, México.

<sup>6</sup> Programa ACD/ChemSketch 1994-1998 Advanced chemistry development Inc. Toronto, Canada

## **IV. PARTE EXPERIMENTAL**

### **1. Material e instrumentación empleado**

✓ **TÉCNICA UTILIZADA:**

Espectrofotometría Ultravioleta

Espectrofotometría infrarrojo cercano

✓ **PRINCIPIO ACTIVO Y EXICIPIENTES**

Clonixinato de lisina lote 109

Metabisulfito de sodio

Propilenglicol

Alcohol etílico

Alcohol bencílico

✓ **REACTIVOS:**

Hidróxido de sodio 0.1N

✓ **EQUIPO UTILIZADO**

Balanza analítica Mettler Toledo modelo HR7

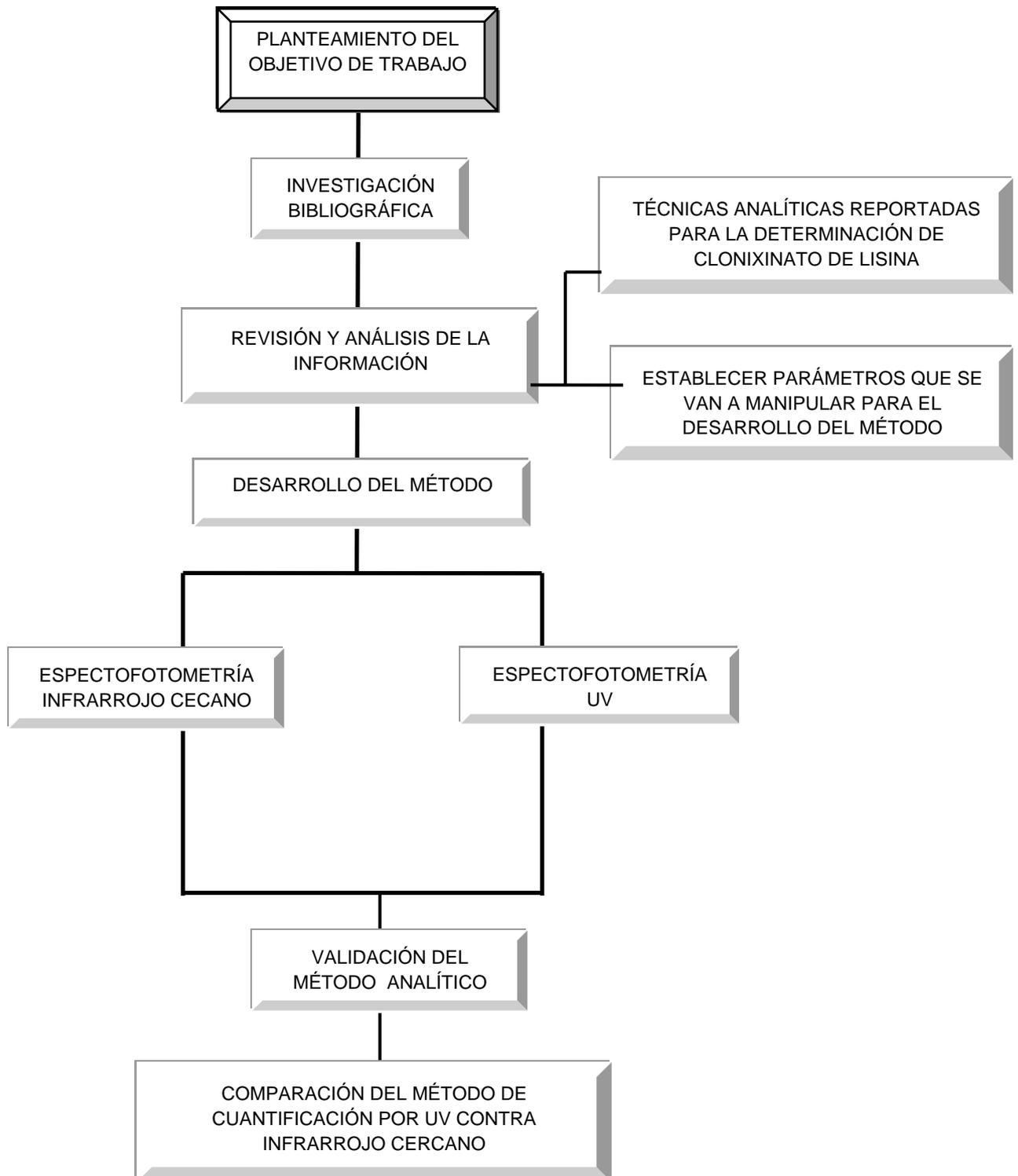
Purificador de agua Millipore (Milli Q)

Espectrofotómetro Cary 100

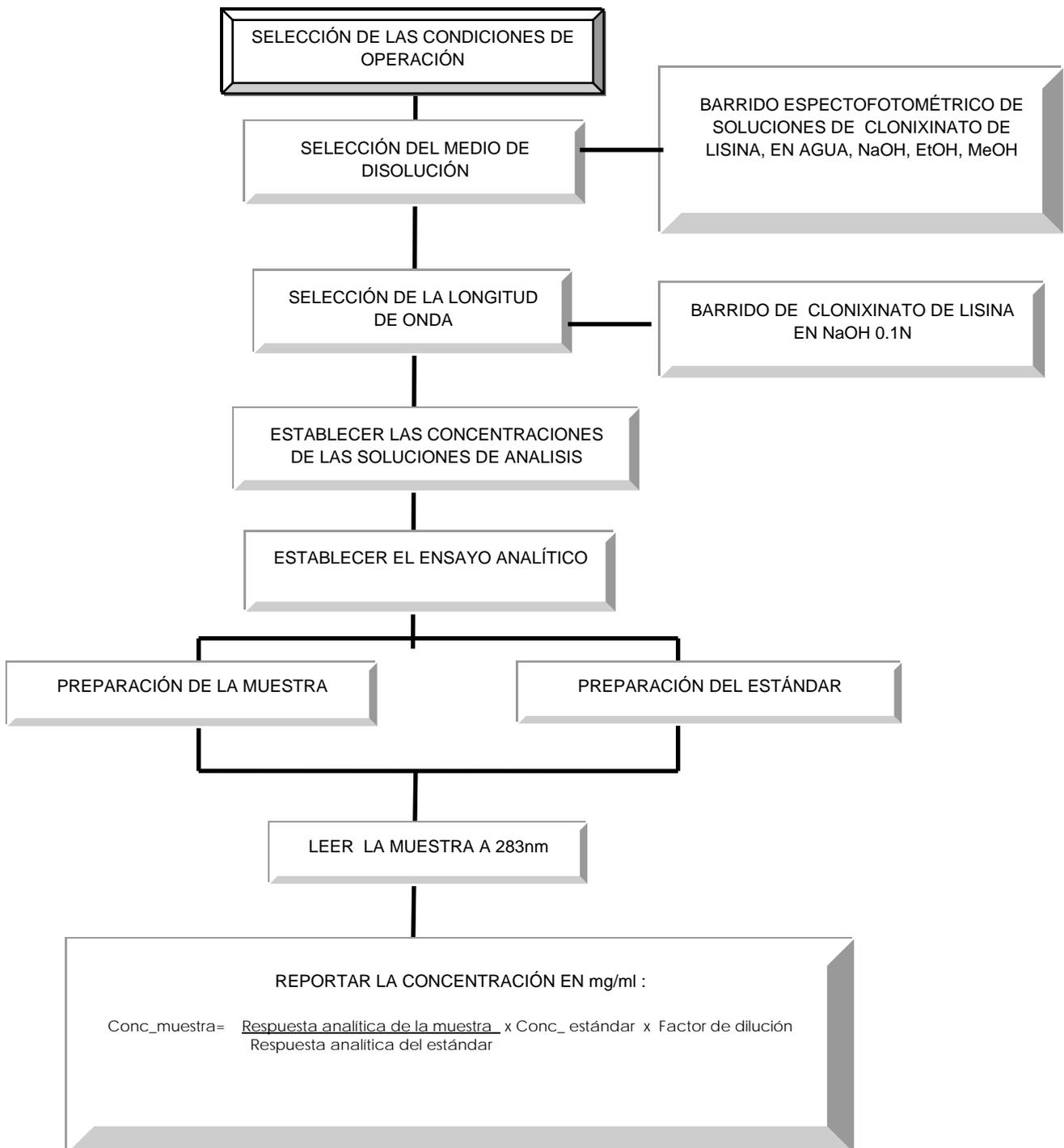
Espectrofotómetro Rapid Content Analyser de FOSS NIRSystem Model 6500

## 2. Método

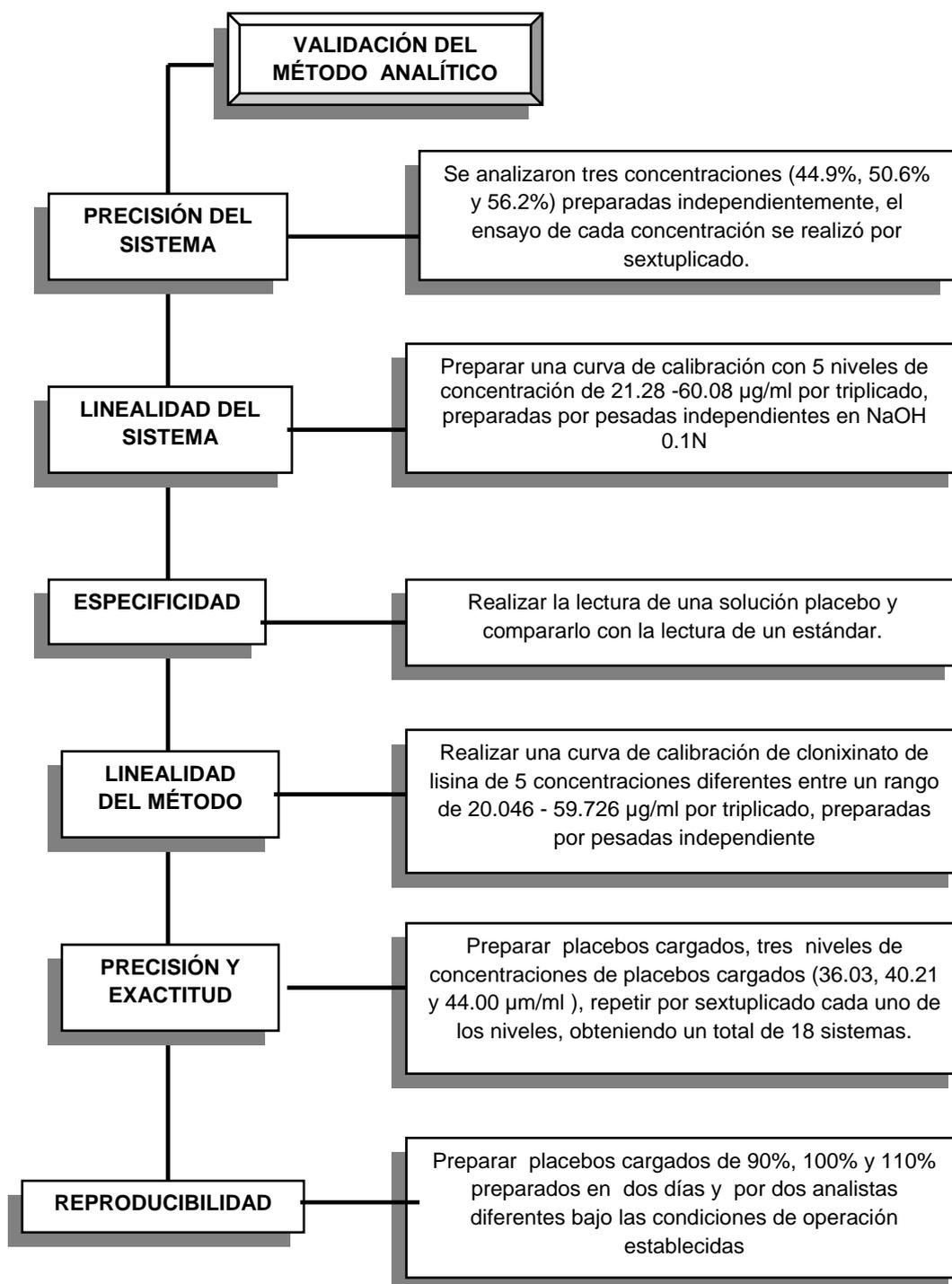
### 2.1 Esquema general



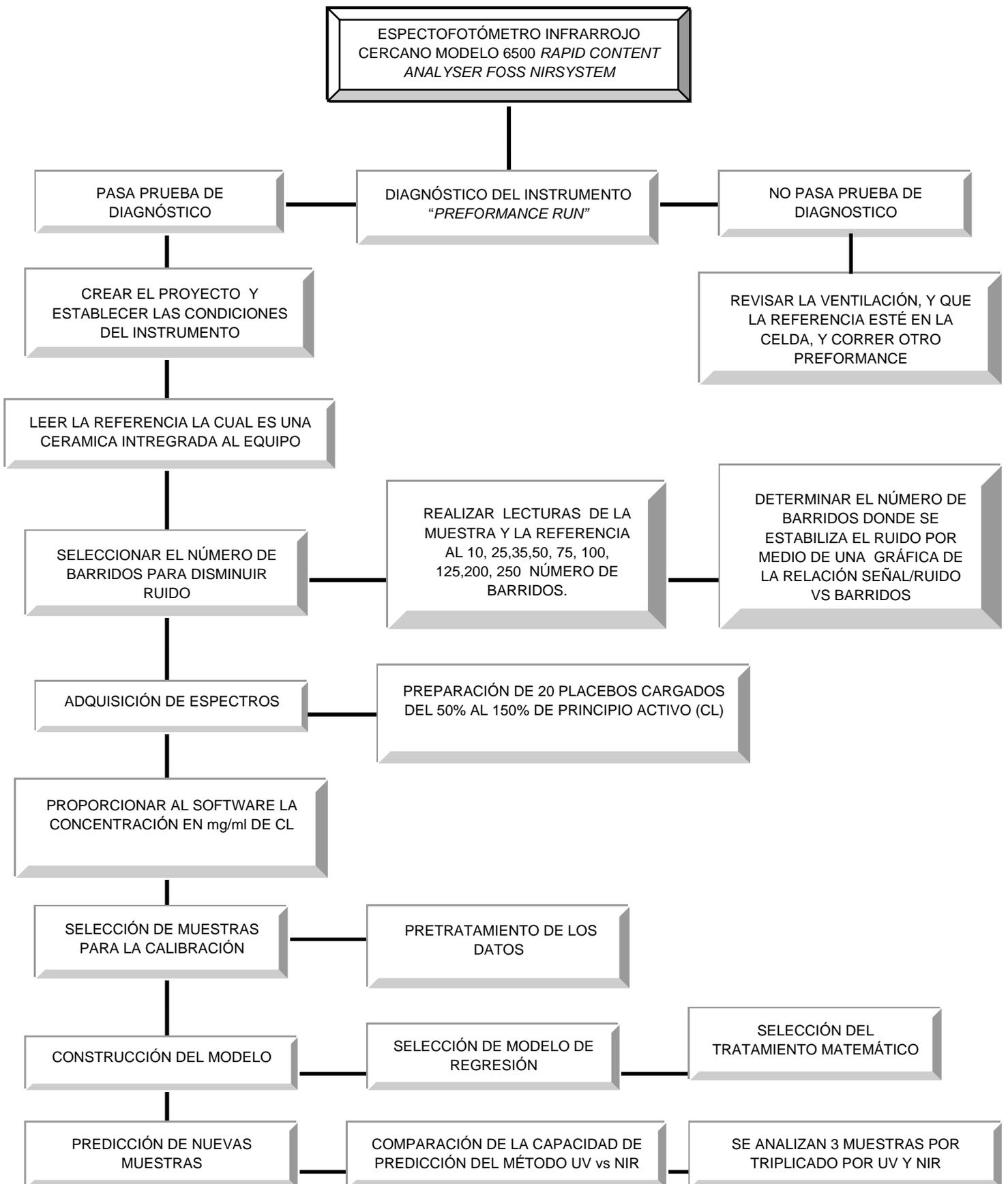
## 2.2 Esquema del desarrollo del método analítico por UV



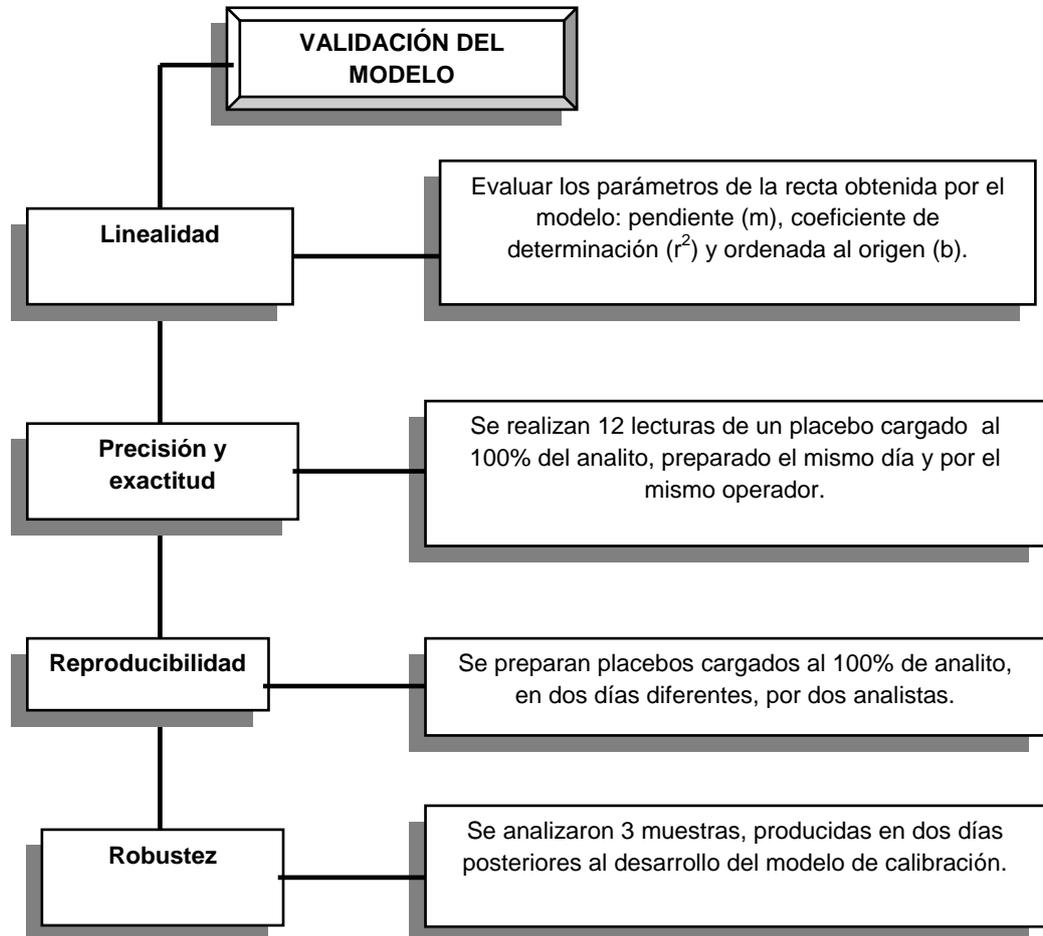
### 2.3 Esquema para la validación del método analítico por UV



## 2.4 Esquema del desarrollo del método analítico por NIR



2.5 Esquema par la validación del modelo desarrollado en (NIR)

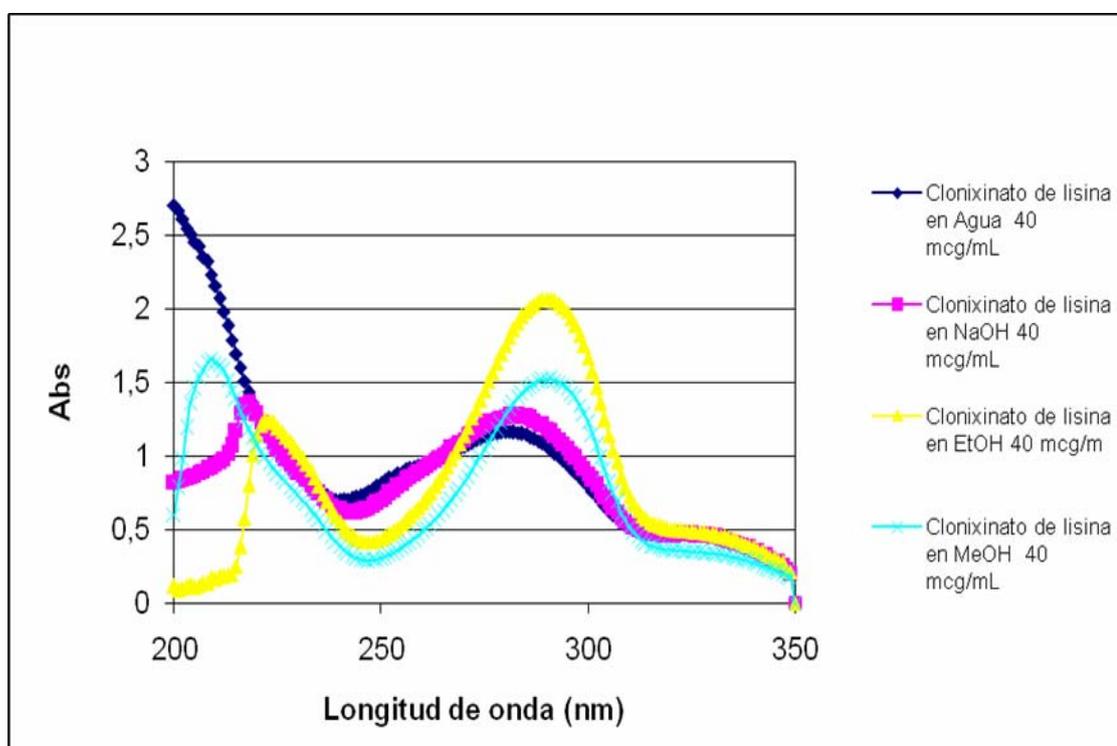


## V. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 1. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO POR UV

#### Condiciones espectrofotométricas

Con el propósito de establecer las condiciones espectrofotométricas adecuadas para el desarrollo del método analítico, se obtuvieron los espectros de absorción del clonixinato de lisina en NaOH 0.1N, Agua, Metanol y Etanol en un intervalo de longitud de onda de 200 a 350 nm.



**Figura 9.** Espectros de soluciones de clonixinato de lisina en 4 diferentes medios

Se observa en la Fig. 9 que la absorbancia que presenta el CL en metanol y etanol es más alta que la que se observa en agua y NaOH, por lo que el medio de disolución escogido para el análisis fue NaOH ya que el clonixinato de lisina es más soluble y estable en soluciones alcalinas que en agua.

En la Fig. 9 se observan dos picos en el espectro de absorción del clonixinato de lisina en NaOH 0.1N; a las longitudes de onda de 217 y 283 nm. La longitud de onda seleccionada para desarrollar el método fue 283nm porque presenta una menor pendiente,

esto representa una menor variación en la respuesta analítica y por lo tanto una mejor precisión.

### Concentraciones para la cuantificación

Para la validación del método analítico con fines de determinación de contenido químico, se utilizó un intervalo de concentración entre 50 y 150% de la concentración teórica para el estudio de linealidad. En la tabla 6 se presenta las concentraciones utilizadas para el método analítico.

**Tabla 6.** Intervalo de concentración para el método analítico

Número del soluciones	Concentración (µg/ml)	% Equivalente
1	20	50%
2	30	75%
3	40	100%
4	50	125%
5	60	150%

### Ensayo Analítico

Una vez determinado el medio de disolución y la longitud de onda para la cuantificación de clonixinato de lisina, se estableció un ensayo analítico sencillo y rápido.

#### Preparación del estándar de CL

1. Pesar en forma aproximadamente exacta 50 mg de clonixinato de lisina.
2. Colocarlo en un matraz volumétrico de 50 mL.
3. Disolver el clonixinato de lisina con 50 ml NaOH 0.1N.
4. Llevar a la marca de aforo con NaOH 0.1 N.
5. Tomar 5 mL de la solución anterior con una pipeta volumétrica.
6. Transferirlos a un matraz volumétrico de 25 mL.
7. Llevar a la marca de aforo con NaOH 0.1 N.

La muestra a analizar debe estar a 25°C, debido a que contiene disolventes orgánicos como excipientes, y éstos modifican su densidad por la temperatura.

#### Preparación de la muestra

1. Tomar 1 mL de muestra con una pipeta volumétrica.
2. Transferirla a un matraz volumétrico de 50 mL.
3. Llevar a la marca de aforo con NaOH 0.1 N.
4. De la solución anterior tomar 1 mL. con una pipeta volumétrica
5. Transferirlos a un matraz volumétrico de 25 mL.
6. Llevar a la marca de aforo con NaOH 0.1 N.
7. Llevar al espectrofotómetro y leer a la longitud de onda de 283 nm.

#### Lectura y estimación

La lectura tanto del estándar como de muestras se leerán en el espectrofotómetro a 283 nm ajustando a cero con NaOH 0.1N

Las concentraciones de las muestras se estimarán a partir de la absorbancia obtenida, y relacionando la concentración del estándar (40µm/ml) y la absorbancia de ésta. El estándar lleva el mismo tratamiento que la muestra, y la preparación de estándar debe hacerse al haber cambio de analista, día, temperatura, equipo.

El resultado se reporta de la siguiente forma:

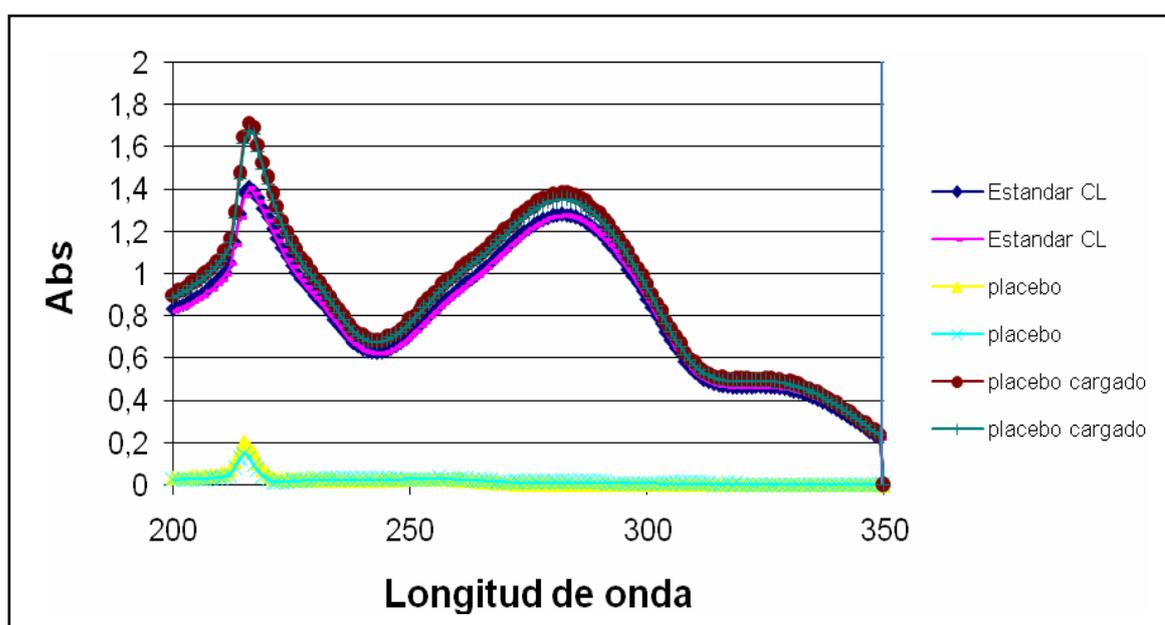
$$\text{Conc\_muestra} = \left[ \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del estándar}} \right] \times \text{Conc\_estándar} \times \text{Factor de dilución}$$

## 2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DESARROLLADO POR UV

La validación del método analítico se llevó a cabo de acuerdo a lo establecido en la Guía de Validación del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos y a la ICH. Las características evaluadas para el sistema fueron la linealidad y la precisión; las características evaluadas para el método fueron linealidad, la precisión, exactitud y reproducibilidad.

### ESPECIFICIDAD

La determinación de la especificidad del método confirma que la medida de la señal es debida solamente al analito. Para determinar ésta característica, se analizó una solución estándar de 40 µg/ml de Clonixinato de lisina, placebo cargado al 100 % y una solución placebo, los resultados obtenidos se observan en la Fig.10.



**Figura 10.** Comparación de los espectros de absorción de una solución estándar de clonixinato, placebo cargado al 100% y placebo para la especificidad del método. (Análisis realizado por duplicado).

En la guía de validación de CNQFB se indica, que para métodos de contenido químico, se deben analizar placebos del producto, como lo indica el método, muestras del producto, y cuando proceda: sustancias relacionadas, precursores, homólogos y una mezcla del producto con ellos o cualquiera de ellos.

Como no se contaba con los productos de degradación del clonixinato de lisina; únicamente se analizó un placebo del producto, un estándar y un placebo adicionado, se observó que los componentes de la formulación no interfieren con la señal generada por el

clonixinato de lisina (Fig. 10); por lo que el método es específico para valorar el contenido de los analitos en la forma farmacéutica mencionada.

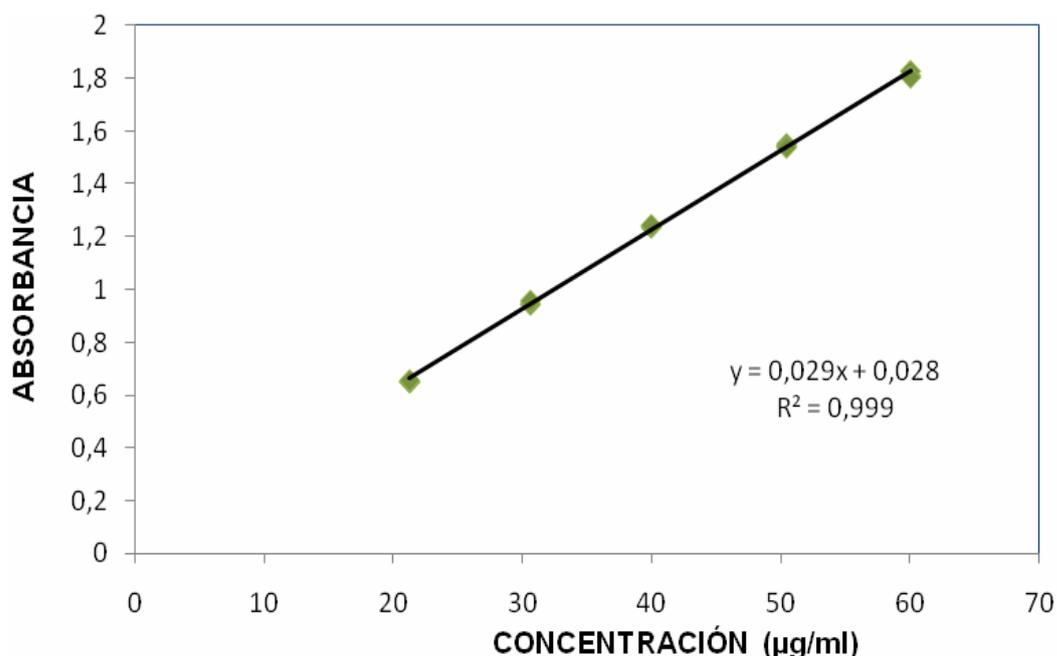
### LINEALIDAD DEL SISTEMA

La linealidad del sistema se evaluó mediante la preparación de una curva de calibración de clonixinato de lisina de 5 concentración diferentes entre un intervalo de 21.28 -60.08 µg/ml por triplicado, preparadas por pesadas independientes en NaOH 0.1N, como se muestra en la tabla 7.

**Tabla 7.** Concentración adicionada y la respuesta analítica (absorbancia) obtenida para evaluar la linealidad del sistema

Sistema	Concentración (µg/ml)	Respuesta analítica (Abs)	Abs/Concen. (A/C)
1	21.28	0.6516	0,0306
		0.6513	0,0306
		0.6579	0,0309
2	30.64	0.9462	0,0309
		0.9471	0,0309
		0.9589	0,0313
3	40.00	1.2417	0,0310
		1.2368	0,0309
		1.2456	0,0311
4	50.48	1.5445	0,0306
		1.5521	0,0307
		1.5398	0,0305
5	60.08	1.8122	0,0302
		1.8291	0,0304
		1.8057	0,0301

Para evidenciar la linealidad del sistema en la Fig. 11 se muestra que el cambio de la respuesta analítica del clonixinato de lisina es directamente proporcional a la concentración. En la tabla 8 se presenta los parámetros estadísticos obtenidos del análisis de regresión, observando que los resultados se encuentran dentro de los límites de aceptación establecidos.



**Figura 11.** Gráfico de respuesta analítica (absorbancia) con respecto a la concentración de clonixinato de lisina obtenido para evaluar la linealidad del sistema.

**Tabla 8.** Parámetros obtenidos del análisis de regresión de la linealidad del sistema

Parámetros estadísticos de la regresión	Valor obtenido	Criterio de Aceptación	Observación
R <sup>2</sup>	0.9991	R <sup>2</sup> ≥ 0.98	Cumple
Pendiente (m)	0.029	-	-
Intercepto (b)	0.028	-	-
IC(B <sub>0</sub> )	-1.2352 - 1.2928	IC(B <sub>0</sub> ) debe incluir el cero	Cumple
C.V	1.12	C.V < 2%	Cumple

Una prueba para corroborar que existe una relación lineal entre la concentración de clonixinato de lisina y la respuesta analítica, es el análisis de variancia presentado en la tabla 9, para la cual se establece la siguiente hipótesis:

**HIPÓTESIS**

- Ho: No existe una relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica
- Ha: Existe una relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica.

**Criterio de aceptación**

- Si  $F_{cal} < F_{crítica}$  no se rechaza Ho
- Si  $F_{cal} > F_{crítica}$  se rechaza Ho

**Tabla 9.** Análisis de variancia realizado para determinar la linealidad del sistema considerando un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ .

Fuente de variación	gl	SC	CM	F	Valor crítico de F
Regresión	1	2.55500	2.55500	14847.9766	2.8782E-21
Residuos	13	0.00223	0.00017		
Total	14	2.5572			

De acuerdo a la hipótesis y a los resultados obtenidos del análisis de variancia ( $F_{cal} > F_{crítica}$ ), lo cual demuestra que si hay relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica

**PRECISIÓN DEL SISTEMA**

Para evaluar la precisión del sistema se analizaron tres concentraciones 44.9, 50.6 y 56.2 $\mu$ g / mL preparadas independientemente, el ensayo de cada concentración se realizó por sextuplicado. Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Respuesta analítica obtenida para evaluar la precisión del sistema

Sistema	Concentración (µg / mL)	Respuesta Analítica (Abs)	A/C
1	44.9	1.3745	0,0306
		1.3722	0,0306
		1.3685	0,0305
		1.3735	0,0306
		1.3699	0,0305
		1.3664	0,0304
2	50.6	1.542	0,0305
		1.527	0,0302
		1.5282	0,0302
		1.5337	0,0303
		1.532	0,0303
		1.5349	0,0303
3	56.2	1.7676	0,0315
		1.7792	0,0317
		1.7692	0,0315
		1.7722	0,0315
		1.7719	0,0315
		1.7725	0,0315

Desviación	0.000557
Promedio	0.0308
<b>CV</b>	<b>1.809</b>

En la tabla 10 se puede observar que el valor del coeficiente de variación obtenido, está dentro de los criterios de aceptación ( $CV < 2\%$ ), y por cual se considera que el método es preciso.

### LINEALIDAD DEL MÉTODO

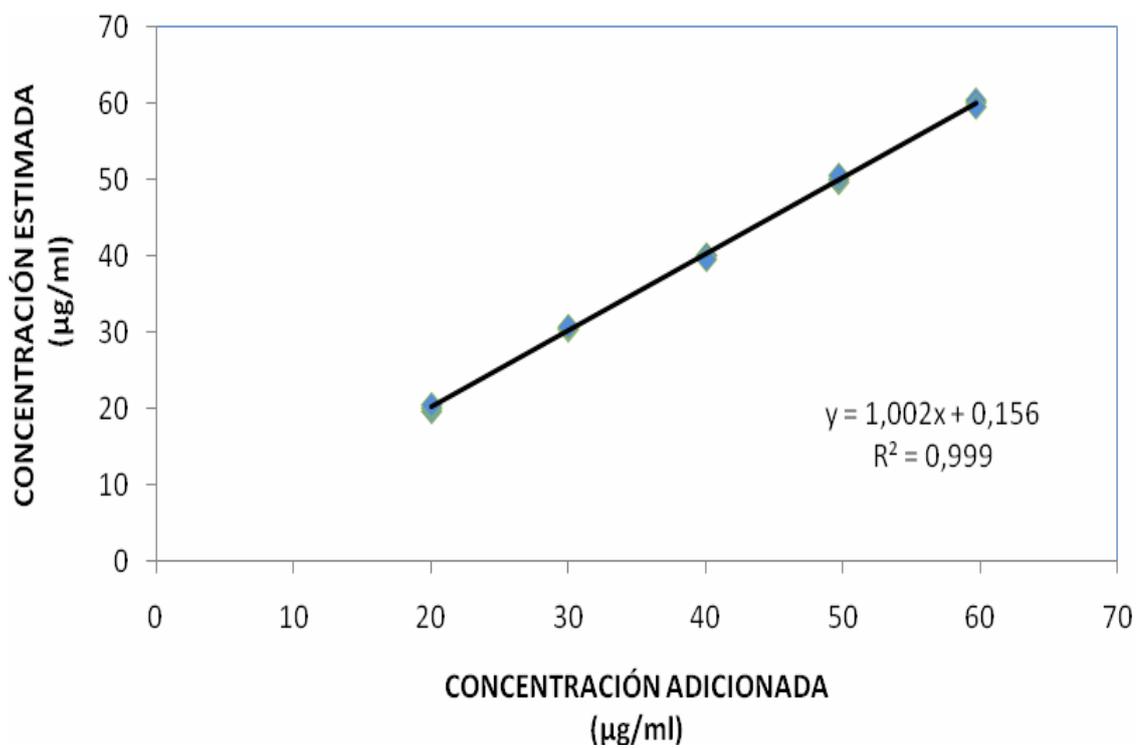
La Linealidad del método se evaluó mediante la preparación de 5 concentraciones de placebos cargados entre un intervalo de 20.046 - 59.726  $\mu\text{g/ml}$ , analizados por triplicado. En la tabla 11 se muestran los resultados del porcentaje de recuperación de clonixinato de lisina.

**Tabla 11.** Concentración adicionada, y el porcentaje de recuperación para evaluar la linealidad del método

Nivel	Concentración adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración estimada ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Adicionado	% Estimado
50%	20.046	19.7217	100.416	98,382
		20.1716		100,627
		20.5561		102,544
76%	30.01	30.4115	100.117	101,338
		30.5894		101,931
		30.7928		102,608
100%	40.08	40.0891	100.096	100,023
		40.1526		100,181
		39.5998		98,802
125%	49.723	49.7094	100.006	99,973
		50.0780		100,714
		50.6117		101,787

<b>150%</b>	59.721	60.1082	100.101	100,648
		60.4450		101,212
		59.5776		99,760

Promedio	100.702
Desvest	1.2402
<b>C.V</b>	1.23



**Figura 12.** Gráfico de concentración adicionada con respecto a la concentración estimada para evaluar la linealidad del método.

**Tabla 12.** Parámetros obtenidos del análisis de regresión de la linealidad del método

Parámetros estadísticos de la regresión	Valor obtenido	Criterio de Aceptación	Observación
$R^2$	0.999	$R^2 \geq 0.98$	Cumple
Pendiente (m)	1.002	$m=1$	Cumple
Intercepto (b)	0.156	$b=0$	Cumple
C.V.	1.2315	$CV \leq 2\%$	Cumple
IC( $B_1$ )	0.5975 – 4.4064	IC( $B_1$ ) debe incluir la unidad	Cumple
IC( $B_0$ )	- 2.1097 – 32.109	IC( $B_0$ ) debe incluir el cero	Cumple
IC( $\mu$ )	100.010 -- 101.373	IC( $\mu$ ) debe incluir el 100% o el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo.	Cumple

La relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración estimada se puede visualizar en la Fig. 12, donde el resultado obtenido del método resulta cercano a la cantidad de analito conocida, por lo que la recta de regresión tiene un valor de la pendiente mayor a 1 y el de la ordenada mayor a 0; sin embargo esto es aceptable ya que nunca se obtendrá valor iguales a 1 y 0, esto nunca ocurre en la práctica, aún si los errores sistemáticos<sup>6</sup> están ausentes, la presencia de errores aleatorios<sup>7</sup> conduce a tener una dispersión de los puntos alrededor de la línea del cuadrado medio y pequeñas desviaciones de la estimación de la pendiente y el intercepto. [Massart, 1997].

En la tabla 12 se muestran los parámetros estadísticos obtenidos de la regresión y los intervalos de confianza de la pendiente, intercepto y del porcentaje de recobro. El intervalo de confianza del porcentaje de recobro no incluye en 100%, pero el promedio

<sup>6</sup> Error sistemático es aquel que se produce de igual modo en todas las mediciones que se realizan de una magnitud. Puede estar originado en un defecto del instrumento, en una particularidad del operador o del proceso de medición. Esto se predecibles y esperados.

<sup>7</sup> Error aleatorio es aquel error indeterminado, que se produce de variables incontrolables en cada medida, siempre esta presente y no se puede ser corregido. Una de las causas es el ruido de un instrumento.

aritmético de % de recobro es de 100.702% se incluye en el intervalo de confianza por lo que todos los parámetros estadísticos se encuentran dentro de los criterios de aceptación establecidos.

Para corroborar que existe una relación lineal entre la concentración de clonixinato de lisina y la respuesta analítica se realizó el análisis de variancia presentado en la tabla 13, para la cual se establece la siguiente hipótesis:

**HIPÓTESIS**

- Ho: No existe una relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica
- Ha: Existe una relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica.

**Criterio de aceptación**

- Si  $F_{cal} < F_{crítica}$  no se rechaza Ho
- Si  $F_{cal} > F_{crítica}$  se rechaza Ha

**Tabla 13.** Análisis de variancia realizado para determinar la linealidad del método considerando un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ .

Fuente de variación	gl	SC	CM	F	Valor crítico de F
Regresión	1	2959.195857	2959.19585	16599.88	1.39481E-21
Residuos	13	2.317461011	0.17826623		
Total	14	2961.51331			

De acuerdo a la hipótesis y a los resultados obtenidos del análisis de variancia ( $F_{cal} > F_{crítica}$ ) lo cual se evidencia que sí hay relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración estimada.

**PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO**

Para evaluar la exactitud y la precisión del método se analizaron tres concentraciones diferentes de placebos cargados (36.03, 40.21 y 44.00  $\mu\text{m/ml}$ ), por sextuplicado, bajo las condiciones normales de operación. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 14.

**Tabla 14.** Concentraciones adicionadas y los porcentajes de recobro obtenidos para evaluar precisión y exactitud

Sistema	Concentración Adicionada ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Resultado analítico (mg de CL/ ml)	% Recobro
1	36.0368	35.8774	99.56
		36.05741	100.06
		36.0868	100.14
		36.1719	100.38
		36.3912	100.98
		36.0901	100.15
2	40.2128	40.9593	101.86
		40.8939	101.69
		39.9580	99.37
		41.1360	102.25
		40.4488	100.57
		40.1151	99.76
3	44.0064	43.7800	99.49
		43.8520	99.65
		43.7899	99.51
		44.2054	100.45
		44.1269	100.27

		44.3102	100.69
		Promedio	100.9245
		Desviación	1.3198
		CV	1.31

En la tabla 15 se presentan los datos estadísticos estimados para determinar la precisión del método y se puede observar que los valores del coeficiente de variación obtenidos para cada nivel de concentración son menores a 2%, por lo que se comprueba que la dispersión de los datos es aceptable y el método se considera preciso.

**Tabla 15.** Parámetros estadísticos para la precisión y exactitud del método

Parámetro estadísticos	Valor obtenido	Criterio de Aceptación	Observación
CV	1.3077	CV ≤ 2%	Cumple
IC( $\mu$ )	99.61 - 101.25	IC( $\mu$ ) debe incluir el 100%	Cumple

**Tabla 16.** Parámetros estadísticos para determinar la precisión del método

Concentración ( $\mu\text{m/ml}$ )	Promedio (% recobro)	Desviación estándar (% recobro)	Coficiente de variación (% recobro)
36.0336	100.21	0.47	0,46
40.2128	101.06	1.03	1.01
44.0064	100.01	0.53	0,53

La exactitud del método se evaluó con el C.V global, que tiene un valor de 1.31%, así como con el intervalo de confianza global (99.61-101.25%). En la tabla 17 se muestran los resultados obtenidos y se observa que en los tres niveles de concentración así como el intervalo de confianza global incluye el 100%.

**Tabla 17.** Intervalos de confianza para evaluar exactitud del método.

Concentración (µm/ml)	INTERVALOS DE CONFIANZA % DE RECOBRO AL 95%	
	LIC	LSC
36.0336	99.746	100.675
40.2128	99.7223	102.1285
44.0064	99.484	100.535
Global	99.606	101.247

También se realizó la prueba de t de Student para la que se estableció la siguiente hipótesis.

**HIPÓTESIS**

Ho:  $\mu_{\% \text{Recobro}} = \mu_{\% \text{Adicionado}}$  no se rechaza Ho lo que implica que el método es exacto

Ha:  $\mu_{\% \text{Recobro}} \neq \mu_{\% \text{Adicionado}}$  se rechaza Ho lo que implica que el método no es exacto

**Criterio de aceptación**

Si  $t_{\text{cal}} < t_{\text{critica}}$  no se rechaza Ho y por tanto el método es exacto.

**Tabla 18.** Resultados de la prueba de t de Student, evaluada para la exactitud del método considerando un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$

Concentración (µm/ml)	t calculada	T critica
36.0336	-0.5676	2.57
40.2128	0.56036	
44.0064	0.3721	

Como se observa en el tabla 18 los valores de la  $t_{\text{cal}}$  en los tres niveles de concentración son menores al valor de la  $t_{\text{critica}}$ , por lo tanto Ho no se rechaza, con lo cual se comprueba que el método es exacto.

**REPETIBILIDAD Y PRECISIÓN INTERMEDIA DEL MÉTODO**

La precisión intermedia del método, se evaluó mediante la estimación por triplicado de la concentración 90, 100 y 110% de placebos cargados preparados en dos días y por dos analistas diferentes bajo las condiciones de operación establecidas. En la tabla 19 se muestran los porcentajes de recobro obtenidos para cada analista en diferentes días

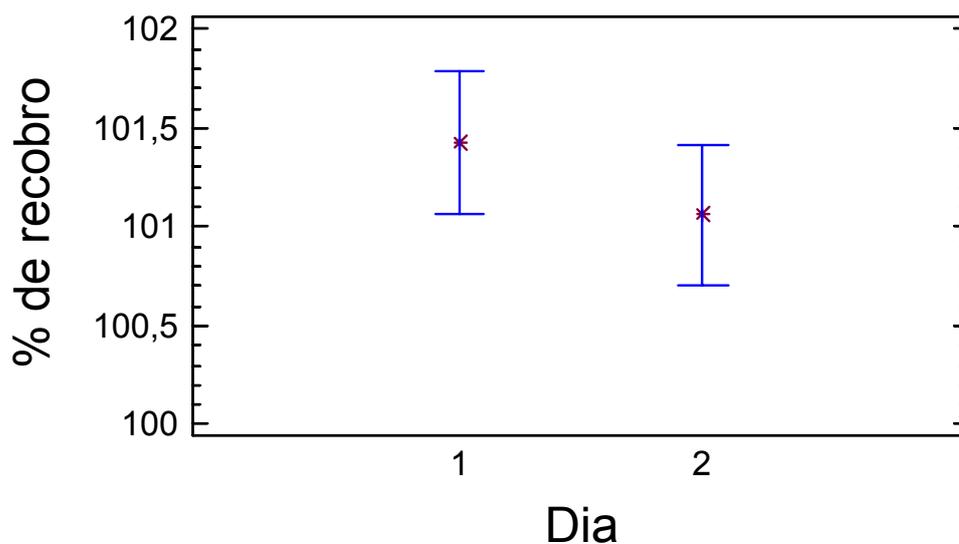
**Tabla 19.** Coeficientes de variación de los porcentajes de recobro obtenidos para evaluar la repetibilidad y precisión intermedia del método (C.V.< 2%).

	% RECOBRO		C.V.
	ANALISTA 1	ANALISTA 2	
<b>DÍA 1</b>	101.106	101.127	0.6953
	102.184	101.412	
	102.184	102.06	
	101.147	99.64	
	100.890	100.41	
	102.040	101.29	
	100.43	101.43	
	101.035	100.44	
	101.816	101.69	
<b>C.V.</b>	0.63135	0.7453	
<b>DÍA 2</b>	101.38	99.28	0.7719
	99.77	100.58	
	99.26	99.87	
	99.28	101.37	
	100.50	101.064	
	100.34	100.92	
	100.06	99.16	
	99.85	99.20	
	99.14	100.20	
<b>C.V.</b>	0.7176	0.8497	
		<b>C.V. GLOBAL</b>	0.933

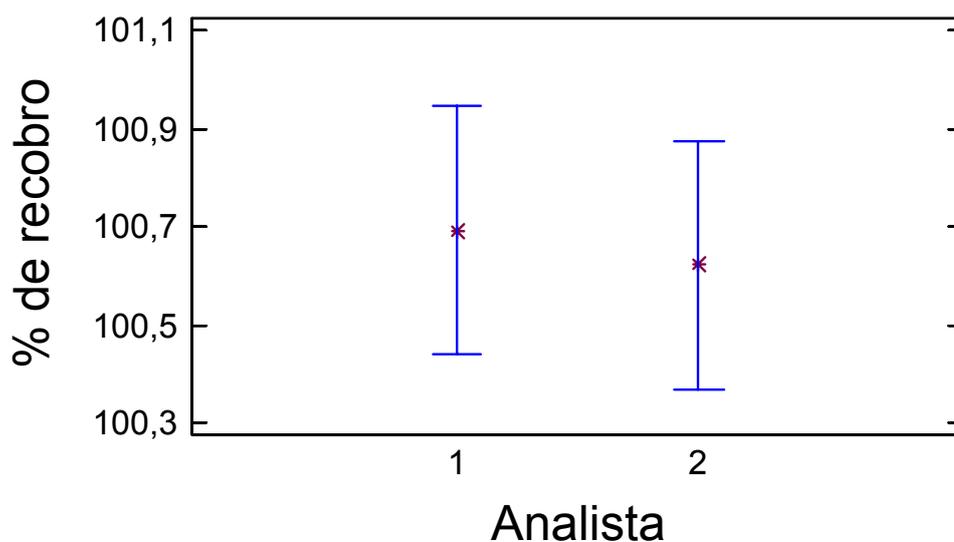
Para determinar si existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos por los dos analistas en los dos diferentes días, se realizó un Análisis de Variancia Anidado, en el cual se estableció como factor fijo el analista y como factor aleatorio el día.

**Tabla 20.** Análisis de variancia para evaluar la precisión intermedia, del método considerando un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$

Fuente de variación	gl	SC	CM	F	Valor crítico de F	Probabilidad
Analista	1	0,0440	0,0440	0,0795	4,1491	0,8045
Día(analista)	2	13,0881	6,5441	11,8079	4,1491	0,0001
Error	32	17,7347	0,5542			
Total	35	30,8669				



**Figura 13.** Comparación de la variabilidad de porcentaje de recobro de Clonixinato de lisina entre día de análisis



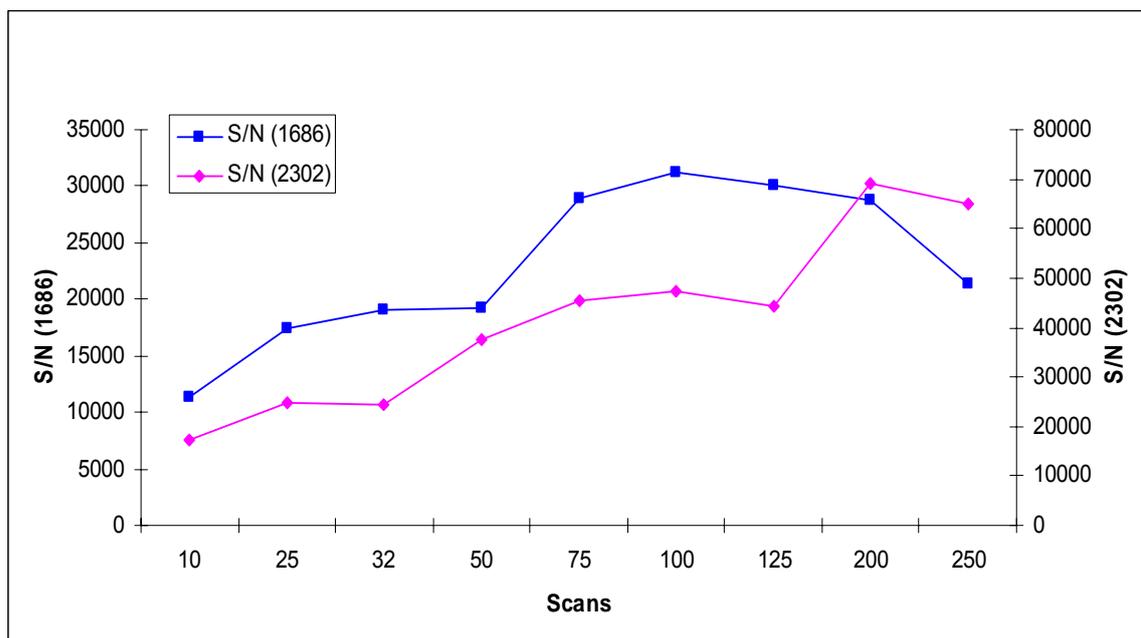
**Figura 14.** Comparativo de la variabilidad de porcentaje de recobro de Clonixinato de lisina entre analistas

Los resultados del análisis de variancia indican que no hay diferencia significativa, entre los porcentajes de recobro obtenidos por diferentes analistas (valor de  $P > 0.05$ ), lo que significa que el método analítico es reproducible; pero en el caso de la repetibilidad se observa que el valor de  $P$  menor a 0.05, esto representa que existe una mayor variación entre los datos, se puede considerar que el método es repetible\* (norma 177) debido a que el coeficiente de variación es menor al 3% ( $C.V \text{ global} = 0.98$ ) por lo que el método es repetible entre día.

### 3. DESARROLLO DEL MÉTODO POR NIR

#### Condiciones espectrofotométricas

Se determinó el número de barridos donde el ruido es menor en la señal, para la cual primero es necesario dejar calentar el equipo durante tres horas para que se estabilice. Después se realiza una curva de la relación Señal-Ruido (S/N) para determinar el número de barridos a la cual la relación se estabiliza. En la fig. 15 se muestra a tendencia de la S/N a los diferentes números de barridos.



**Figura 15.** Gráfico de señal-ruido en función del número de barridos.

El número de barridos, con mayor estabilidad en la respuesta es a 100 barridos. A este número es a la que se leerán las futuras muestras, con esto se disminuye la señal del ruido del equipo. En la fig. 16 se observa la señal del ruido a 100 barridos, en la cual es más estable la señal de la muestra.

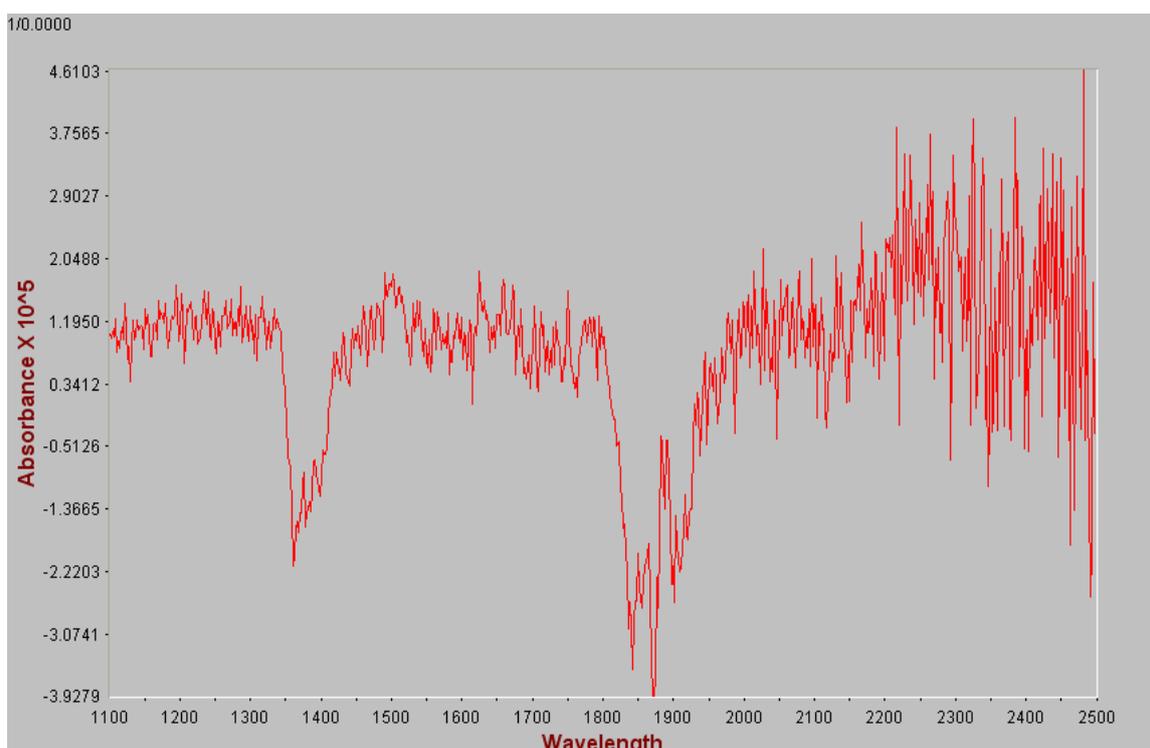


Figura 16. Señal de ruido a 100 barridos

### Concentraciones para la cuantificación

En el análisis de productos farmacéuticos, uno de los problemas principales es la disponibilidad de un conjunto de muestras que cubran un intervalo de concentración adecuado para establecer una ecuación de calibración fiable, puesto que todos los lotes de fabricación tienen un contenido de principio activo y excipientes próximos al valor establecido para la formulación. En este trabajo, el intervalo de concentración se extendió del 50 al 150%, con el fin de que éste método pueda ser utilizado en estudios posteriores de estabilidad acelerada y a largo plazo.

Tabla 21. Intervalo de concentración para el método analítico

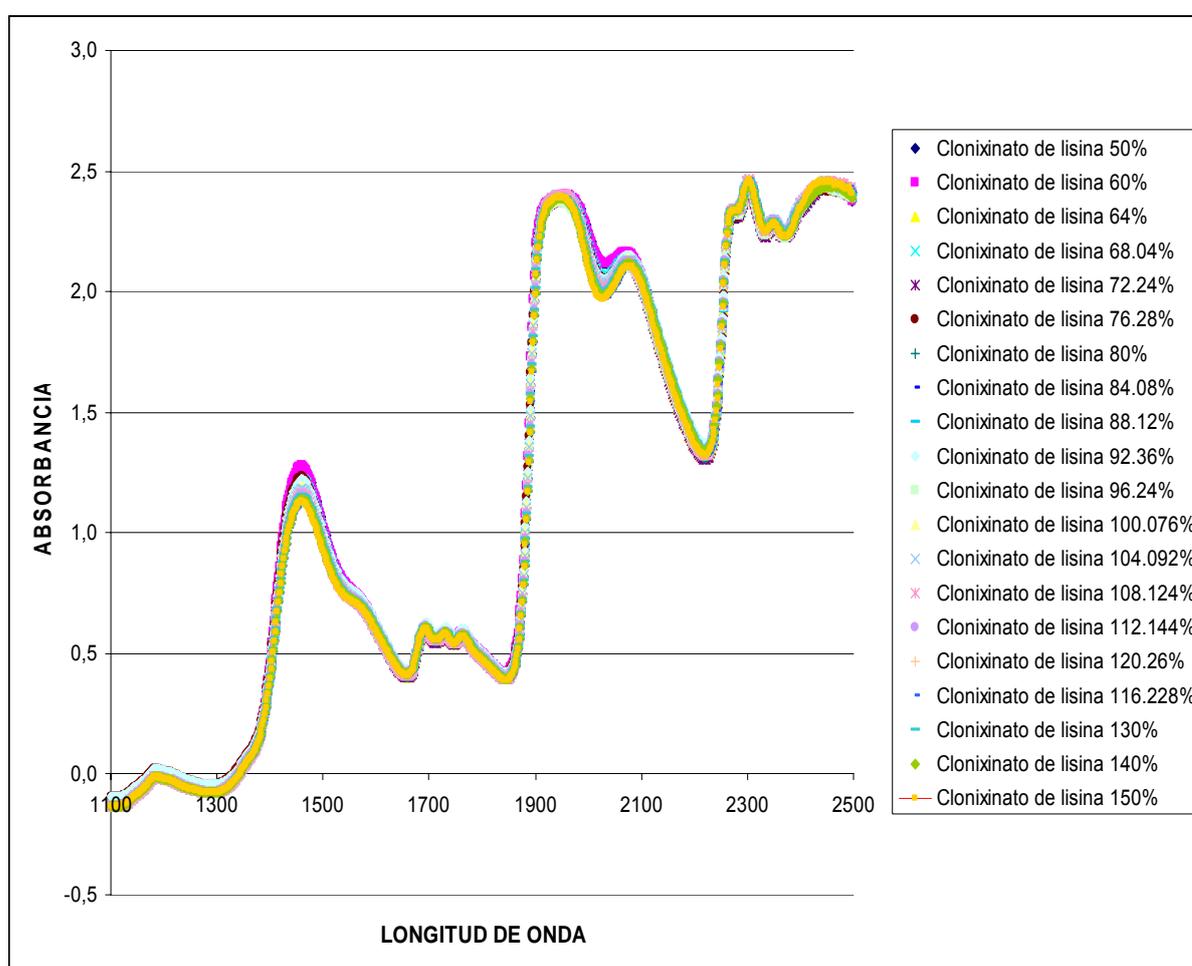
Número del sistema	Concentración (mg/ml)	% Equivalente
1	25.00	50%
2	30.00	60%
3	32.00	64%

4	34.00	68%
5	36.00	72%
6	38.00	76%
7	40.00	80%
8	42.00	84%
9	44.00	88%
10	46.00	92%
11	48.00	96%
12	50.00	100%
13	52.00	104%
14	54.00	108%
15	56.00	112%
19	68.00	116%
20	60.00	120%
21	65.00	130%
22	70.00	140%
23	75.00	150%

### 3.1 SELECCIÓN DEL CONJUNTO DE MUESTRAS DE CALIBRACIÓN

Las muestras que se leen, poseen la variabilidad física y química que pudiera darse durante el análisis de rutina, con la finalidad de obtener una buena capacidad predictiva. El conjunto de calibración (o *training*) son representativas de todo el intervalo de concentración que puede estar en una muestra.

Se obtiene la respuesta analítica de todos los placebos cargados, como se muestra en la fig.17 a cada espectro se le proporciona los datos en peso de Clonixinato de lisina agregados a cada solución; éstos son almacenados y quedan disponibles para su posterior tratamiento.



**Figura 17.** Espectros de absorción de las soluciones de Clonixinato de lisina por infrarrojo cercano

### 3.2 PRETRATAMIENTO ESPECTRAL

La construcción del modelo implica una serie de tratamientos previos de la señal para hallar la relación más simple entre la señal analítica y la propiedad a determinar, que para fines de este trabajo es la concentración del analito.

Estos pretratamientos de la señal reducen las contribuciones del ruido, es decir los componentes o efectos no deseados presentes en la señal obtenida, este ruido puede tener diferentes causas u orígenes, por lo que puede afectar de forma distinta al espectro. Puede haber ruido debido a los componentes de la instrumentación utilizada para el registro del espectro (ruido instrumental), debido a variaciones de temperatura, humedad u otras condiciones ambientales durante el registro (ruido ambiental) o bien variaciones en la señal debidas a la propia naturaleza de la muestra. El procesamiento previo de la respuesta analítica permite corregir el efecto de los compontes ajenos a la información buscada, mejorando así la exactitud y precisión de los resultados.

El tratamiento aplicado para reducir el ruido de la señal en este caso es la segunda derivada, la cual elimina los desplazamientos de línea base y corrige las desviaciones causadas por los términos constantes que varían linealmente con la longitud de onda. En la figura 18 se observa el espectro después de aplicar la segunda derivada.

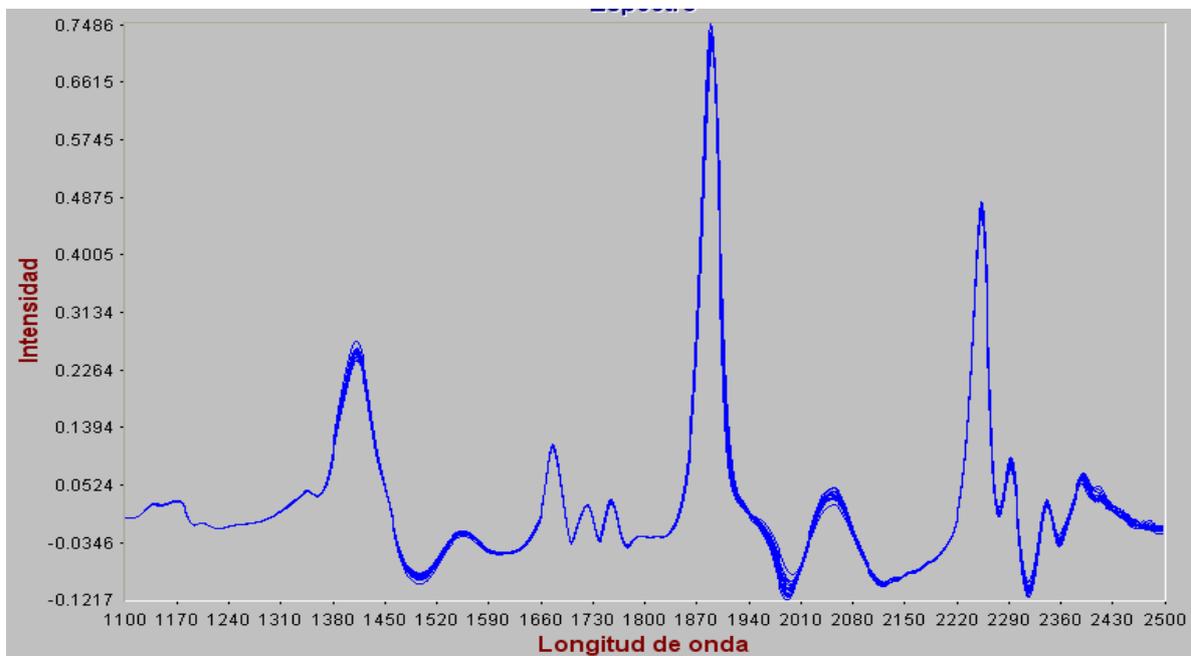
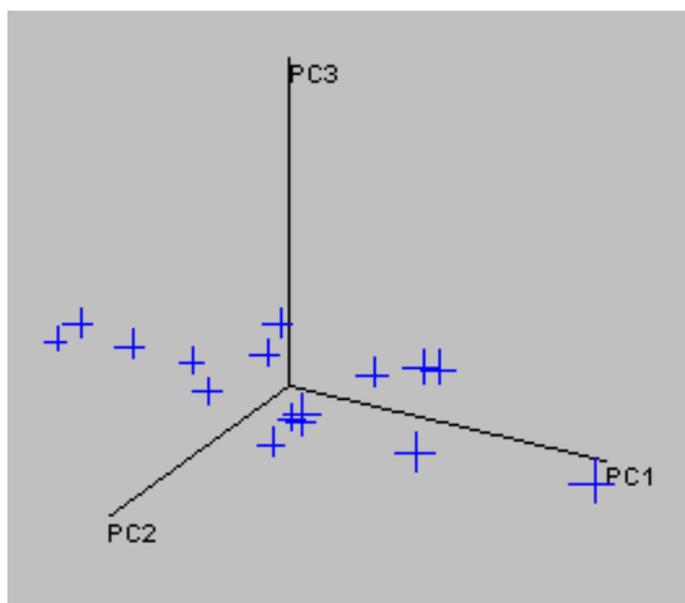


Figura 18. Espectro de las muestras aplicando la segunda derivada

Debido al gran volumen de información que proporciona el método instrumental, uno de los campos de la quimiometría ha sido el desarrollo de métodos de cálculo capaces de reducir este gran volumen de información para que ésta quede contenida, sin pérdida relevante en un número reducido de variables

En la figura 19 se muestra el gráfico de tres direcciones que explica la máxima variabilidad de las muestras utilizadas y éstas son utilizadas como nuevos ejes de coordenadas, denominadas componente principal (PC).



**Figura 19.** Variabilidad de la muestras en tres ejes de PCs

Cada componente principal contiene información de diferente relevancia. Los primeros PCs describen la fuente de variación más importante de los datos. El conjunto de datos espectrales descritos por variables correlacionadas, quedan de esta forma definidos por conjunto de variables PCs no correlacionadas entre si en un nuevo sistema de ejes ortogonales.

### 3.3 MÉTODO DE CALIBRACIÓN

El proceso de calibración permite establecer la relación entre la respuesta instrumental y la propiedad del analito a determinar, utilizando a tal efecto un conjunto de muestras representativas.

Las técnicas espectrofotométricas proporcionan un gran número de variables respuestas para cada muestra, variables que en general no pueden ser asignadas sólo a un

analito. Por lo que se tiene que hacer uso de los métodos de calibración multivariante, ya que estos son capaces de relacionar múltiples variables con la propiedad a determinar.

Una vez que fueron escogidos los conjuntos de calibración, se construyeron diferentes modelos PLS (Mínimos cuadrados parciales), utilizando distintos modos espectrales e intervalos de longitudes de onda.

a) Evaluación de la capacidad predictiva del modelo

El objetivo de la calibración es obtener parámetros que permitan calcular la propiedad a determinar en futuras muestras de forma que los valores obtenidos difieran lo menos posible de los valores reales, es decir que el residual, tenga un valor lo menor posible.

Para poder asegurar la bondad de un modelo en la predicción de muestras distintas a las utilizadas en la calibración, es necesario realizar un proceso de validación del modelo que consiste en el estudio cuantitativo de los resultados de la aplicación del modelo construido a nuevas muestras,

La validación puede utilizar un proceso interno (*cross-validacion*) [Geraldí, 1985] o puede ser un proceso externo. En este trabajo se llevó a cabo la validación con el proceso externo, utilizando muestras independientes de las utilizadas en el calibrado, pero representativo del mismo y de las futuras muestras a analizar, denominado conjunto de validación. La concentración de las muestras del bloque de validación es conocida; por lo tanto, es posible comprobar como se comporta el modelo propuesto en el cálculo de concentraciones de muestras distintas a las utilizadas en la construcción del mismo.

Para evaluar su capacidad predictiva se utilizan parámetros que permitan evaluar el error medio de toda la población, no sólo de unas muestras. Para ello se puede utilizar la sumatoria del cuadrado de los residuales ( $\sum (y_{ij} - Y_{ij})^2$ ), denominado habitualmente SCRCP (Suma del Cuadrado de los Residuales de predicción) o en siglas en ingles PRESS, también se puede ocupar el RCMEP (Raíz media del cuadrado del error de Predicción) o RMSEP, el ECP (Error cuadrado de Predicción) o en sus siglas en ingles SEC. En la tabla 22 se presenta los datos para cada uno de los pretratamiento de PLS.

**Tabla 22.** Pretratamientos espectrales del método

	Pretratamiento espectral del método										
	Sin pretratamiento	N-Point smooth		1era derivada		Corrección de línea base(BC)		BC y 1era derivada	N-Point smooth y BC		N-Point smooth y BC
Intervalo espectral	1116-1278 y 1672-1838	1116-1278 y 1672-1838		1116-1278 y 1672-1838		1116-1278 y 1672-1838		1116-1278 y 1672-1838	1116-1278 y 1672-1838		1116-1248
Factores	5	4	5	8	9	4	5	8	4	5	7
PRESS	6.8306	7.5037	6.7312	11.817	16.065	7.9783	8.2626	11.813	6.8867	9.2962	10.7098
SEP	1.4179	2.0419	1.0883	0.7828	0.6096	0.8069	1.4039	0.7836	0.6937	0.4022	1.5995
RMSEP	1.1688	1.225	1.1602	1.5373	1.7924	1.2631	1.2855	1.5370	1.1736	1.3635	1.4635
Pendiente	0.9825	0.9861	0.9871	1.0191	1.0261	1.0011	0.9805	1.0191	1.0172	1.022	1.023
Coefficiente de determinación	0.9479	0.9978	0.9975	0.996	0.998	0.9972	0.9976	0.9961	0.9994	0.9992	0.9865
Ordenada al origen	-1.3036	-1.9599	-0.9087	-0.1897	0.3991	-0.501	-1.266	-0.1909	-0.061	-0.129	0.7953

En base al análisis, los mejores tratamientos son suavizado espectral y corrección de línea base, ya que el valor de SEP es menor, los valores de  $r^2$  es cercano a 1 (0.99991) la pendiente está alrededor de 1 (1.017) y la ordenada al origen está próxima a 0 (-0.061). Se encontró que la precisión de los modelos ensayados están influenciados por el contenido de agua, así los mejores resultados se obtuvieron usando un intervalo de longitud de onda de (1116-1278 y 1672-1838nm), donde el analito presenta absorción y las bandas de agua quedan excluidas. Las regiones donde absorbe el agua son entre 1400 y 1940 (ver anexo 3)

b) Elección del numero de factores y longitud de onda para corrección de línea base

A la corrección de línea-suavizado hay que determinar el número de factores y la longitud de onda de la corrección de línea base más adecuado donde se obtengan valores de SEP más bajos y valores de la curva con más poder predictivo

**Tabla 23.** Resultados de la variación de longitud de onda de corrección de línea base

	LB 1842nm		LB 1844nm		LB 1845nm		LB 1846nm	
Factores	4	5	4	5	4	5	4	5
PRESS	7.6339	9.9476	7.056	9.4793	7.056	9.4793	6.8867	10.0149
SEP	0.6954	0.3936	0.6894	0.3821	0.6894	0.3821	0.6956	0.4022
RMSEP	1.2356	1.41050	1.1879	1.3769	1.1879	1.3769	1.1736	1.4152
RMSEC	0.4412	0.3911	0.4197	0.3884	0.4197	0.3884	0.4038	0.3814
Pendiente	1.009	1.01	1.014	1.0174	1.014	1.0174	1.0176	1.0223
Coeficiente de determinación	0.9994	0.999	0.9994	0.9991	0.9994	0.9991	0.9994	0.9992
Ordenada al origen	-0.633	0.0132	-0.689	-0.044	-0.689	-0.044	-0.618	0.4022

Los modelos a 1844, 1845, 1846 nm producen resultados muy similares con valores de SEP que varían entre 0.38 y 0.40 (ver tabla 23) por lo que se puede utilizar cualquiera de las tres longitudes, para obtener resultados correctos, en este caso se utilizó la longitud de onda de 1844nm para la corrección de línea base.

Durante la etapa de calibración el algoritmo PLS1 utiliza información de la matriz de datos espectroscópicos y de la matriz de concentraciones, obteniéndose variables auxiliares llamadas variables latentes, factores o componentes.

Para la elección del número de componentes Wold sugiere representar el valor de PRESS frente al número de componentes y buscar el mínimo. Esto porque el error disminuye al aumentar el número de componentes que se utilizan en el modelo, hasta que llega un momento en que los nuevos componentes introducidos únicamente explican el ruido el PRESS aumenta debido al sobreajuste del modelo.

El método descrito por Haaland y Thomas escoge el número de componentes cuyo PRESS no es significativamente más grande que el mínimo PRESS del modelo, evitando así el sobreajuste [Haaland and Thomas,1988]. Para hacer la comparación se puede hacer la prueba de Fisher donde:

$$F(a)= \frac{\text{PRESS (modelo con a componente s)}}{\text{PRESS (modelo con a* componente s)}}$$

Donde: a\* el numero de componentes con el menor valor de PRESS

a es el numero de componentes menor o mayor

El software calcula el PRESS para cada factor fig. 20 siendo el factor 4 el que tiene menor valor de PRESS (7.0559), pero cuando el conjunto de predicción externo se somete al modelo, da menor valor de SEP cuando se ocupan 5 factores (ver tabla 24). Si se aumenta el número de factores a 6 el valor de SEP aumenta (1.37), y la recta se sobreajusta dando valores de pendientes menor a 1 (0.98)y valores de pendiente de -1.25.

Tabla 24. Valor de PRESS para cada factor

NÚMERO DE FACTORES	PRESS
Factor 1	827,6342
Factor 2	463,4861
Factor 3	23,4241
Factor 4	7,0559
Factor 5	9,4793
Factor 6	10,4795
Factor 7	12,1332
Factor 8	11,2788
Factor 9	10,1876
Factor 10	10,5068
Factor 11	13,9329
Factor 12	18,6682
Factor 13	19,1201

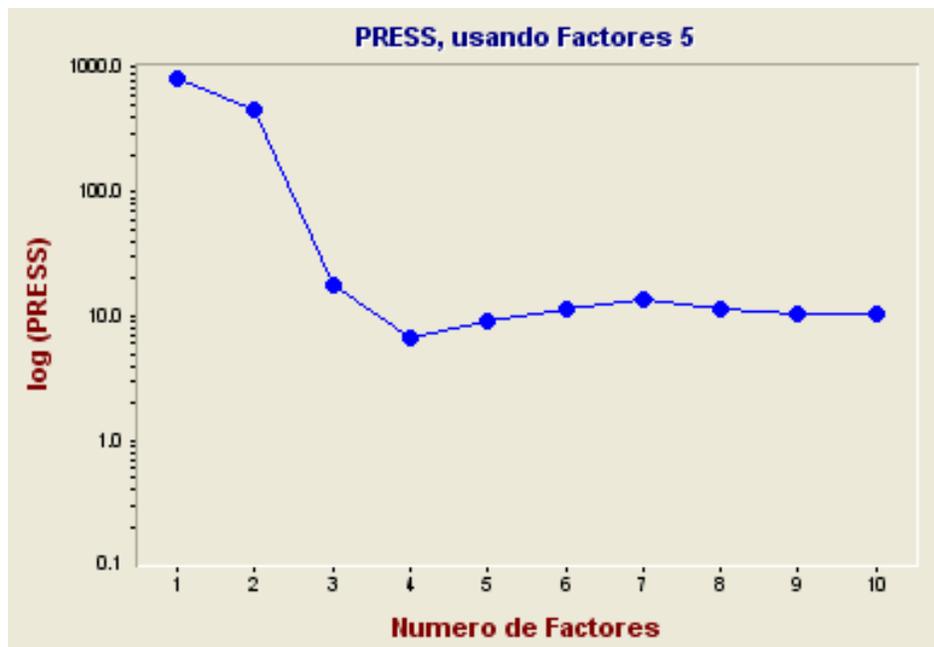


Figura 20. Gráfico de valores de PRESS con respecto al número de factores.

En base a lo anterior se tomaron 5 factores como número de componentes del modelo, Para corroborar que se eligió el número de componente óptimo se aplica la prueba de Fisher, estableciendo las siguientes hipótesis

### **HIPÓTESIS**

Ho: El número de componente es óptimo para el modelo

Ha: El número de componente no es óptimo para el modelo

### **Criterio de aceptación**

$F(a) < F_{0.25,16,16}$  no se rechaza Ho lo que implica es un componente óptimo

$F(a) > F_{0.25,16,16}$  se rechaza Ho lo que implica que no es un componente óptimo

$$F(a) = \frac{9.4793}{7.0559} = 1.3434$$

El valor de F calculada =  $F_{0.25,16,16}$  es de 1.4097 por lo que Ho no se rechaza y 5 puede ser usado como número de componentes.

Para el modelo de calibración se escogió PLS obteniendo mejores resultados con un número de factores de 5 y utilizando corrección de línea base a 1844 nm y suavizado espectral.

## **4. VALIDACIÓN DEL MODELO DESARROLLADO POR INFRARROJO CERCANO**

Históricamente, una validación en NIR se consideró para ser la verificación de procesos, con la correlación entre resultados de NIR y un método de referencia usando una apropiada estadística o rutina quimiométrica. El termino de validación en el contexto de regulación de métodos en NIR, se refiere para el establecimiento de apropiados datos y documentación para certificar que el método funciona para que se esta desarrollando.

Como no existen normas de validación específicas para el NIR, es aceptado las guías de ICH como una plantilla de formato para un proyecto de validación para un método en NIR. [Ciurczak, 2001]

Según la guía ICH y la Guía de CQFB en la validación de un método se han de considerar estudios de precisión, exactitud, intervalos de concentración, linealidad y robustez. Sin embargo, su aplicación a un método NIR presenta algunos aspectos discutibles, especialmente en los referentes a linealidad, exactitud y robustez.

### **PRECISIÓN Y EXACTITUD**

Normalmente la precisión se determina al evaluar tres parámetros: repetitividad, precisión intermedia y reproducibilidad. En este caso, dado que el método se va a utilizar como análisis de control interno, no es necesario realizar el estudio de reproducibilidad.

La repetibilidad se determinó realizando 12 análisis de la misma muestra, el mismo día y por el mismo operador. Como se observa en el tabla 25 para todas las muestras el coeficiente de variación (CV) fue 0.64%, claramente inferior al límite habitualmente aceptado (2%)

**Tabla 25.** Porcentaje de recuperación de una muestra para la repetibilidad del modelo.

<b>MEDIDA</b>	<b>% ADICIONADO</b>	<b>% DE RECOBRO</b>
1	100.076	101,797
2	100.076	101,756
3	100.076	101,083
4	100.076	101,086
5	100.076	102,871
6	100.076	100,760
7	100.076	101,058

8	100.076	100,960
9	100.076	100,287
10	100.076	101,446
11	100.076	101,548
12	100.076	101,778
Promedio		101,369
Desviación		0,65795
CV		0,6491

Asimismo, se realizó la prueba de t de Student para evaluar la exactitud del modelo, para la cual se estableció la siguiente hipótesis.

### HIPÓTESIS

Ho:  $\mu_{\% \text{Recobro}} = \mu_{\% \text{Adicionado}}$  no se rechaza Ho lo que implica que el método es exacto

Ha:  $\mu_{\% \text{Recobro}} \neq \mu_{\% \text{Adicionado}}$  se rechaza Ho lo que implica que el método no es exacto

### Criterio de aceptación

Si  $t_{\text{cal}} < t_{\text{critica}}$  no se rechaza Ho y por tanto el método es exacto

**Tabla 26.** Resultados de la prueba de t de Student, para evaluar la exactitud del método considerando un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$

Concentración ( $\mu\text{m/ml}$ )	t calculada	t critica
50.023	0.2364	2.2004

Como se observa en el tabla 26 el valor de la  $t_{\text{cal}}$  es menor al valor de la  $t_{\text{critica}}$ , por lo tanto Ho no se rechaza, y se comprueba que el método es exacto.

**LINEALIDAD**

Para probar la linealidad, se muestra la figura 27, en la cual se observa que el valor de concentración calculado por NIR frente a la cantidad adicionada para el conjunto de muestras evaluadas, si existe de una relación lineal que se puede ver en la inspección visual que se confirma con los análisis estadísticos realizados.

**Tabla 27.** Concentración adicionada, y el porcentaje de recuperación para evaluar linealidad

Nivel	Concentración adicionada (µg/mL)	Concentración estimada (µg/mL)	% Adicionado	% Estimado
50%	25,010	24,898	100,040	100,550
60%	30,000	30,264	100,000	100,580
64%	32,000	32,273	100,000	100,983
68%	34,020	32,996	100,059	95,612
72%	36,120	36,096	100,333	100,388
76%	38,140	38,317	100,368	100,634
80%	40,000	40,432	100,000	101,397
84%	42,020	42,498	100,048	100,523
88%	44,060	43,768	100,136	99,800
92%	46,180	46,008	100,391	100,034
96%	48,120	48,274	100,250	100,069
100%	50,038	50,430	100,076	100,380
104%	52,050	51,474	100,096	99,350

<b>108%</b>	54,060	53,868	100,111	100,393
<b>112%</b>	56,040	56,020	100,071	99,706
<b>116%</b>	58,110	58,077	100,190	99,725
<b>120%</b>	60,130	60,293	100,217	100,288
<b>130%</b>	65,001	65,108	100,166	99,774
<b>140%</b>	70,007	70,016	100,023	99,878
<b>150%</b>	75,286	75,106	100,141	100,087

Promedio	100,008
Desviación	1,141
CV	1,141

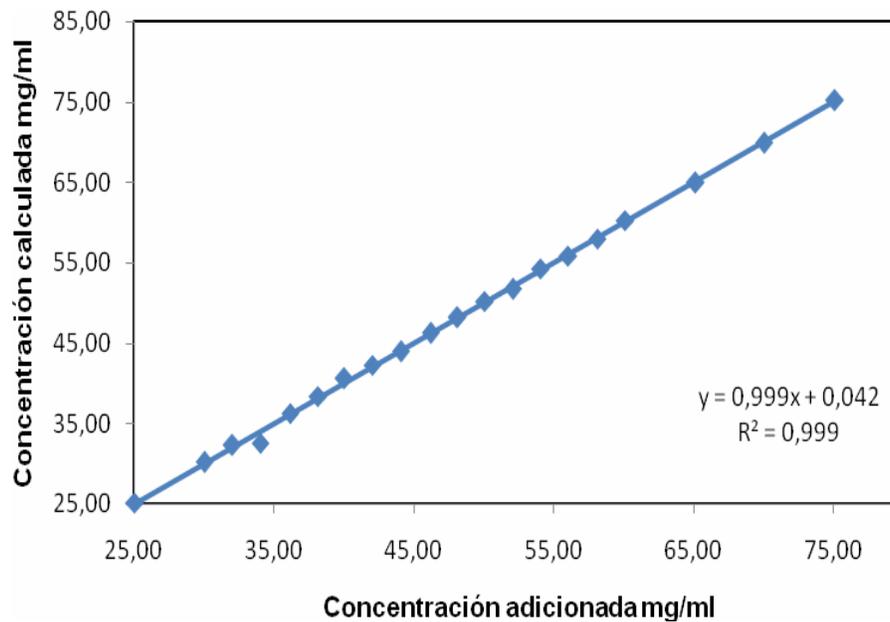


Figura 21. Gráfico de concentración adicionada contra la concentración calculada por el modelo

**Tabla 28.** Parámetros obtenidos del análisis de regresión de la linealidad del método

Parámetros estadísticos de la regresión	Valor obtenido	Criterio de Aceptación	Observación
$R^2$	0.999	$R^2 \geq 0.98$	Cumple
Pendiente (m)	0.999	$m=1$	Cumple
Intercepto (b)	0.042	$b=0$	Cumple
C.V.	1.141	$CV \leq 2\%$	Cumple
IC( $B_1$ )	0.723 - 1.275	IC( $B_1$ ) debe incluir la unidad	Cumple
IC( $B_0$ )	-13.673 – 33.715	IC( $B_0$ ) debe incluir el cero	Cumple
IC( $\mu$ )	99.40 – 100.62	IC( $\mu$ ) debe incluir el 100%	Cumple

Para corroborar que existe una relación lineal entre la concentración de clonixinato de lisina y la respuesta analítica es el análisis de variancia presentado en la tabla 29, para la cual se establece la siguiente hipótesis:

### HIPÓTESIS

- Ho: No existe una relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica
- Ha: Existe una relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica.

### Criterio de aceptación

- Si  $F_{cal} < F_{crítica}$  no se rechaza Ho
- Si  $F_{cal} > F_{crítica}$  se rechaza Ho

**Tabla 29.** Análisis de variancia realizado para determinar la linealidad del método considerando un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ .

Fuente de variación	gl	SC	CM	Fcal	Valor crítico de F
Regresión	1	1361,29309	1361,29309	7907,83021	1,1287E-20
Residuos	14	2,41002939	0,17214496		
Total	15	1363,70312			

De acuerdo a la hipótesis y a los resultados obtenidos del análisis de variancia ( $F_{cal} > F_{crítica}$ ) se evidencia que si hay relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración estimada para el método de regresión propuesto

**REPETIBILIDAD Y PRECISIÓN INTERMEDIA DEL MODELO**

La precisión intermedia del modelo, se evaluó mediante la evaluación por sextuplicado del 100% de concentración del sistema preparado en dos días y por dos analistas diferentes bajo las condiciones de operación establecidas. En la tabla 30 se muestran los porcentajes de recobro obtenidos para cada analista en cada uno de los días

**Tabla 30.** Coeficientes de variación de los porcentajes de recobro obtenidos para evaluar la precisión intermedia del método

	% RECOBRO		C.V.
	ANALISTA 1	ANALISTA 2	
<b>DÍA 1</b>	99,678	102,116	1.1895
	99,621	102,456	
	99,630	101,890	
	99,121	101,539	
	100,627	101,889	
	101,025	102,204	
<b>C.V.</b>	0.7195	0,310	
<b>DÍA 2</b>	101,984	100,436	0.9577
	99,882	100,882	
	99,529	99,498	
	102,734	100,621	
	101,554	100,609	
	101,145	101,083	
<b>C.V.</b>	1.219	0.548	
		<b>C.V. GLOBAL</b>	1.059

Para determinar si existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos por los dos analistas en los dos diferentes días, se realizó un Análisis de Variancia Anidado, en el cual se estableció como factor fijo el analista y como factor aleatorio el día.

**Tabla 31.** Análisis de variancia para evaluar la reproducibilidad y repetitividad del método considerando un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$

Fuente de variación	gl	SC	CM	F	Valor crítico de F	Probabilidad
Analista	1	0.8682	0.8682	1.17	4,3512	0.2920
Día(analista)	2	10.7224	5.3612	7.20	4,3512	0.0044
Error	20	14.8905	0.7445			
Total	23	26.2823				

Los resultados del análisis de variancia indican que no hay diferencia significativa, entre los porcentajes de recobro obtenidos por diferentes analistas (valor de  $P>0.05$ ), esto significa que el modelo es reproducible. En el caso de la repetibilidad se observa que el valor de P es menor a 0.05, esto representa que existe una mayor variancia entre los datos pero se puede considerar que el método es repetible entre días porque el coeficiente de variación es menor al 3% (C.V global =1.089) según la norma 177.

### ROBUSTEZ

La robustez de un método analítico se evalúa determinando el efecto que producen pequeños cambios en las condiciones de trabajo. Sin embargo este no es el caso de las calibraciones NIR multivariantes, donde el modelo de calibración se desarrolla en un periodo predeterminado y se asume que funciona bien continuamente. Para ello, el instrumento se somete a controles diarios, realizando las diferentes pruebas recomendadas incluidas en el *software* que lo controlan.

En el contexto de la espectroscopía NIR, robustez significa “estabilidad del modelo de calibración a lo largo del tiempo”. De esta manera, se analizaron 3 muestras, producidas en dos días posteriores al desarrollo del modelo de calibración. Lo más conveniente es seguir monitoreando el modelo durante tres meses continuos pero para fines de este trabajo y tiempo limitado solo se evaluará en un corto tiempo.

**Tabla 32.** Porcentajes de recobro en dos días diferentes, por el mismo analista

Muestra	Día 1 % de recobro	Día 2 % de recobro
1	101,797	102,048
2	101,756	103,605
3	101,083	103,995
4	101,086	101,809
5	102,871	103,801
6	100,760	103,347
7	101,058	103,677
8	100,960	100,310
9	100,287	103,265
Promedio	101,2953	102,873
Desvest	0,750634	1,2279219
C.V	0,741035	1,193629
IC( $\mu$ )	100,72 - 101,87	101,93 – 103,82

En la tabla 32 se observa que existe una pequeña diferencia en el coeficiente de variación y los intervalos de confianza no incluyen en 100%, pero el promedio del % de recobro si entra dentro de los intervalos de confianza.

La robustez se ve afectada por el tiempo de análisis, pero es necesario realizar más determinaciones a largo plazo, para comprobar si en realidad el modelo se ve afectado por la producción de muestras a lo largo del tiempo

**5. COMPARACIÓN DEL MÉTODO ESPECTOFOTOMÉTRICO UV CON EL MÉTODO POR NIR**

En la guía de validación de CNQFB, se establece que cuando se quiere comparar 2 métodos analíticos para aplicaciones de contenido se puede emplear estudios de comparación de parámetros de desempeño, y se emplea cuando los dos métodos analíticos han sido validados. Los parámetros a estudiar son especificidad<sup>8</sup>, precisión, exactitud y linealidad del método.

En este trabajo se compararon los siguientes parámetros:

**Tabla 33.** Parámetros de desempeño a comparar de los dos métodos

Parámetros de desempeño	Valor obtenido	Criterios de Aceptación	Observación
Exactitud y Repetibilidad	IC-S <sup>2</sup> = 0.1226 - 1.3439	IC-S <sup>2</sup> = debe incluir el valor de 1	IC-S <sup>2</sup> si cumple
	IC- $\bar{y}$ = -0.3015 -2.0637		IC- $\bar{y}$ si cumple
Precisión intermedia	IC-S <sup>2</sup> = 0.6322 - 2.808	IC- $\bar{y}$ = debe incluir el valor de 0	IC-S <sup>2</sup> si cumple
	IC- $\bar{y}$ = -0.057 - 0.5516		IC- $\bar{y}$ si cumple
Linealidad	IC-S <sup>2</sup> = 30.97 - 264.180	IC-S <sup>2</sup> = debe incluir el valor de 1	IC-S <sup>2</sup> no cumple
	IC- $\bar{y}$ = -1.206 - 0.0951	IC- $\bar{y}$ = debe incluir el valor de 0	IC- $\bar{y}$ si cumple
	IC( $\beta_{11}$ - $\beta_{12}$ )= -4.4362 - 4.483		IC( $\beta_{11}$ - $\beta_{12}$ ) deben de
	IC ( $\beta_{01}$ - $\beta_{02}$ )=-0.206 -		IC( $\beta_{11}$ - $\beta_{12}$ ) si cumple

<sup>8</sup> Este parámetro de cumplir para cada método; ya sea demostrando su especificidad o exactitud

	0.0528	incluir el cero  IC ( $\beta_{01} - \beta_{02}$ ) deben incluir el cero	IC( $\beta_{01}-\beta_{02}$ ) si cumple
--	--------	--	---

IC- $S^2$  =Intervalo de Confianza para la razón de variancias

IC-  $\bar{y}$  =Intervalo de Confianza para la diferencia de las 2 medias poblacionales.

IC( $\beta_{11}-\beta_{12}$ )=Intervalo de confianza para la diferencia de las pendientes

IC ( $\beta_{01} - \beta_{02}$ )= Intervalo de confianza para la diferencia de las ordenadas al origen

En base a los resultados de la tabla 33 se establece que los dos métodos tienen la misma repetibilidad, exactitud y precisión intermedia, por que el intervalo de confianza para razones de variancia (IC- $S^2$ ) incluye el valor de 1 esto quiere decir que las variancias son iguales. Para el caso de linealidad no se tienen la misma repetibilidad en porcentajes de recobro, esto puede deberse a que los dos métodos no tienen la misma transformación matemática por lo que no son comparables.

Cuando se compara la pendiente y la ordenada al origen, se comprueba que no hay diferencia debido a que el intervalo de confianza incluye el valor de cero, por lo que no hay diferencia significativa en la linealidad de los dos métodos con un nivel de significancia de  $\alpha=0.025$

Con estos resultados se comprobó que los dos métodos tienen la misma exactitud, precisión y linealidad, y ambos son confiables para la cuantificación.

Para comparar el porcentaje de recuperación de 3 muestras posteriores a la validación de los correspondientes métodos. Se analizaron 3 muestras por triplicado, por un mismo analista y el mismo día, por NIR y por UV, los resultados se presentan en la tabla 34.

Tabla 34. Porcentaje de recobro de 3 muestras por UV y NIR

MUESTRA	% RECOBRO POR UV	% DE RECOBRO POR NIRS
1	101,290	97,057
	100,608	99,183
	100,850	99,732
2	100,941	101,865
	101,022	100,656
	100,474	100,383
3	98,896	101,158
	98,595	100,834
	98,859	101,565
PROMEDIO	100,171	100,270
DESVEST	1,069	1,470
C.V	1,067	1,466
IC ( $\mu$ )	99,35 – 100,99	99,14 – 100,14

Como se observa existe mayor variación en los datos obtenidos por NIRS, pero para determinar si existe diferencia significativa entre los métodos es necesario realizar la prueba de t student.

**HIPÒTESIS**

Ho:  $\mu_{\%Recobro\ UV} = \mu_{\%Recobro\ NIR}$  no se rechaza Ho lo que implica que no hay diferencia significativa

Ha:  $\mu_{\%Recobro\ UV} \neq \mu_{\%Recobro\ NIR}$  se rechaza Ho lo que implica que existe diferencia significativa

### **Criterio de aceptación**

Si  $t_{cal} < t_{critica}$  no se rechaza  $H_0$  y por tanto no hay diferencia significativa entre los dos métodos

La  $t_{cal}$  obtenida es de 0.0244 y la  $t_{critica}$  es 2.2624 por lo que  $H_0$  se acepta y no existe diferencia significativa entre el método espectrofotométrico UV y el de NIR.

Como se ve en la tabla 34, existe mayor C. V en los porcentajes de recobro en el método de infrarrojo cercano, pero ambos incluyen el 100% en el porcentaje de recobro. La diferencias en los porcentajes de recobro de NIR pueden deberse a ruido ambiental, ya que esta técnica es muy sensible a cambios de temperatura y humedad por lo que es necesario controlar estos factores para poder tener reproducibilidad a los largo del tiempo.

Los dos métodos son aceptables para la cuantificación de Clonixinato de Lisina, en solución, ya que ambos obtuvieron resultados dentro de las especificaciones.

El primer método utilizado para la cuantificación reportado en farmacopea es la espectrofotometría UV, pero el infrarrojo cercano también puede establecerse de forma confiable como método alternativo de cuantificación.

## VI. CONCLUSIONES

Se desarrolló un método analítico para la cuantificación de Clonixinato de Lisina por Espectrofotometría UV. Las condiciones óptimas determinadas para el análisis son: medio de disolución NaOH 0.1N, lecturas a una longitud de 283 nm y 25°C temperatura de análisis.

Se realizó la validación del método analítico por UV, evaluándose los parámetros de precisión, linealidad, especificidad, exactitud y reproducibilidad, mismos que cumplen con los criterios especificados en la guía de validación de métodos analíticos del colegio nacional de QFB's. Por lo que este método puede utilizarse para la cuantificación de Clonixinato de lisina en solución, de forma rápida, económica y confiable.

En el Infrarrojo Cercano se desarrolló el modelo a partir de la construcción de las bibliotecas de espectros, se utilizó análisis multivariante PLS y pretratamientos matemáticos para la corrección de variaciones espectrales (suavizado espectral y corrección de línea base), con el fin de cuantificar Clonixinato de Lisina en una solución inyectable.

Para la validación del modelo de calibración del infrarrojo cercano, se tomaron los criterios de la Guía de validación de de ICH, evaluado precisión, exactitud, linealidad, reproductividad, robustez. Los cuales pudieron evidenciar la idoneidad del modelo, para la cuantificación de clonixinato de lisina en solución. Por lo que el NIR es una buena alternativa a los métodos tradicionales de análisis cuantitativo, por su rapidez, sencillez.

Una vez desarrollado y validado un método de calibración, es importante evaluar los resultados obtenidos a lo largo del tiempo. De esta manera, es posible detectar alteraciones en los valores de predicción, las cuales pueden ser por diversas causas.

Al comparar los resultados de predicción de muestras por Espectrofotometría UV e Infrarrojo cercano, se obtiene menor variación en el % recobro por Espectrofotometría UV, por lo que sería adecuado ampliar el número de muestras que contengan todas las posibles variaciones para el modelo de calibración por NIR; ya que no es posible analizar muestras problemas que presenten variabilidad física o química no contemplada en la calibración.

Los métodos desarrollados para la cuantificación de clonixinato de lisina por UV y NIRS pueden establecerse como métodos de rutina en el control de calidad para una solución inyectable.

La espectrofotometría UV, debe seguir siendo la primera opción de análisis de fármacos por ser una de las técnicas de bajo costo y cortos tiempos de análisis.

Es importante considerar que la espectroscopia de reflectancia difusa en el NIR es un método alternativo y no destructivo para la determinación de principios activos en solución, y no sólo en productos sólidos como se reporta en la mayoría de los artículos. La gran desventaja de esta técnica, es que para cada producto es necesario construir una biblioteca, y no acepta cambios en los constituyentes de la formulación; de esta forma presenta dificultades en la transferencia de calibraciones entre instrumentos, ya que pequeñas diferencias entre ellos, pueden dar lugar a errores importantes en los resultados, lo que puede obligar a que para analizar una misma muestra problema, sea necesario preparar un calibrado en cada instrumento.

---

## VII. REFERENCIAS

### LIBROS Y REVISTAS

1. ALOMAR, Daniel, Fuchslocher. Fundamentos de la Espectrofotometría de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) como método de análisis de Forrajes. Agro sur, 1998, Vol.26, No.1 Valdivia, pp. 88-104. ISSN 0304-8802.
2. ARMENTA, S. Garrigues M. Guardia. (2007). Determination of edible oil parameters by near infrared spectrometry. Analytica Chimica Acta, 596, pp 330-337
3. BLANCO M. Romero M.A.(2001). Strategias for constructing the calibration ser for near infrared spectroscopy quantitation metod. Submitted for publication. Universitat Autònima de Barcelona, pp 1-12
4. BURNS, Donald (2001). "Handbook of Near -Infrared Analysis". Ed Macel Dekker, Inc, New York. pp. 1-35, 71-88, 210-239, 260-300.
5. CAI,Wensheng Yankun Li.. (2008). A variable selection method based on uninformative variable elimination for multivariate calibration of near-infrared spectra. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 90, pp188–194
6. CANDIDA C. Felícioa, Lígia. (2005). Comparison of PLS algorithms in gasoline and gas oil parameter monitoring with MIR and NIR. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 78, pp 74–80
7. CIURCZAK, E.W.(1992). Handbook of Near-Infrared analysis. Practical spectroscopy serie. Vol 13. Marcel Dekker Inc. New York, pp 129-127
8. CIURCZAK, E.W and James Drennen. (2001). Pharmaceutical and Medical Applications of Near-Infrared Spectroscopy serie. Vol 31. Marcel Dekker Inc. New York, pp 107-130

9. COZZOLINO, Daniel, Alberto Fassio. Et al. (2003). Uso de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano para el análisis de calidad de ensilaje de maíz. Agricultura técnica. Vol. 63 No.4 pp.387-393
10. COZZOLINO. D. (2002). "Uso de la espectrofotometría de reflectancia en el infrarrojo cercano NIRS en el análisis de alimentos para animales. "Agrociencias, Vol 1, No.2 pp 25-32
11. GERALDO P., Kowalski B. R. (1985). Applications of near infrared spectroscopy in the pharmaceutical industry. Anal Chem Acta. 1, 185.
12. HAALAND D.M.(1980). Appl. Spectrosc. 34, 539.
13. HAALAND D.M. Thomas E.V. (1988). Statistics for Analysis chemistry. Anal Chem. 60,1193
14. HARRIS, Daniel. (1991). "Análisis Químico Cuantitativo". Ed. Iberoamericana, pp 495-508, 539-566.
15. HAYLEY, P.A Doherty P. eta al.(1996). Journal Pharm. Biomed. Anal. 14,551.
16. HORBART, Willard. (1994). "Métodos Instrumentales de Análisis". Ed. Continental, Mexico. pp. 175-200
17. MASSART D.L, Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., et.al. (1997). "Handbook of chemometrics and qualimetrics". Part A. Ed. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands. pp 379-439
18. MASSART y Vander Heyden (2007). Near-Infrared spectroscopy applications in pharmaceutical analysis. Talanta. 72. pp 865-883
19. MILLAR N. James; Millar C. Jane. (2002). "Estadística y Quimiometría para química analítica". Cuarta Edición. Prentice Hall, España.pp 278

- 
20. MONTGOMERY, D.C. (1991) "Diseño y análisis de experimentos". Grupo editorial Iberoamérica. México, pp 834
  21. NAKANISHI, K, Holden Day. (1962). "Infrared Absorption Spectroscopy". San Francisco.
  22. OHANNESIAN, L.; Streeter, A.J. (2002). "Handbook of pharmaceutical analysis". Ed. Marcel Dekker, USA. Vol. 117. pp 187-224
  23. PASQUINI Celio. (2003) Near Infrared spectroscopy: Fundaments, Practical Aspects and Analytica Applications. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 14, No. 2, pp198-219.
  24. PEREZ- Marin. (2007). Chemometric utilities to archive robustness in liquid NIRS calibrations: Application to pig fat analysis. *Chem and Intell Labo. Systems.* 87, pp 241-246
  25. PINEROS. I. P, Ballesteros, J. L. Lastres. (2002). Extraction and LC determination of lisine cixinate salt in water / oil microemulsions. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 27, pp 747 – 754.
  26. ROBINSON, James. (1974). "Principio de Análisis Instrumental". Ed. Continental, México, pp. 47-57, 85-108.
  27. ROGGO. Yves, Pascal Chalus. (2007) A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* . 44, pp 683-700.
  28. S. Wold, *Technometrics* (1978).20, 397
  29. SAEBO. Solve Trygve Almøy (2008). LPLS-regression: a method for prediction and classification under the influence of background information on predictor variables *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 91, pp 121–132
  30. SKOOG, Douglas. (2001). "Principios de Análisis Instrumental". Ed. Madrid España pp. 322-326, 335-347.

31. TOHER, Deirdre, Gerard Downey. (2007). A comparison of model-based and regression classification techniques applied to near infrared spectroscopic data for food authentication studies. *Chem. and Intell. Laboratory System* 89, pp102-115.
32. VASELA A. Antonio s. Barros. (2007). Infrared spectroscopy and auter product analysis for quantification of fat, nitrogen and moisture of cocoa powder. *Analityca Chimica Acta*. Doi 10.1016/j.aca.2007.08.039 pp 1-10.

### GUÍAS Y NORMAS

33. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (A.E.F.I). *Validación de Métodos Analíticos*. Ed. AEFI, Barcelona, 2001
34. *Guía de validación de métodos analíticos*. Colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos. Edición 2002.
35. *Guidance for industry. Analytical procedures and methods validation*. Chemistry, manufacturing, and controls documentation. FDA, USA, August, 2000.
36. *Guidance for industry. Q2B Validation of analytical procedures: Methodology*. ICH, November 1996.
37. *Guideline for industry. Text on validation of analytical procedures*. ICH- Q2A, March 1995.
38. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998.
39. R. Salazar, *Gestión de la Calidad en el Desarrollo y Fabricación Industrial de Medicamentos*, Tomo II Fabricación industrial, Ed Romargraf S.A. Barcelona, 2000
40. U.S. Pharmacopeia 26. United States Pharmacopeia Convention Inc. 1999
41. *Validation of analytical procedures: Methodology*. ICH, October, 1998.

## TESIS Y PÁGINAS WEB

42. PORCEL, Marta. (2001). Aplicación de técnicas quimiométricas para el desarrollo de nuevos métodos cinéticos espectrofotométricos de análisis. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra, España. pp 5-38.
43. POU, Saboya Nuria. (2002). Análisis de control de preparados farmacéuticos mediante espectroscopía en el infrarrojo cercano. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra, España. pp 5-22, 39-53
44. [http://www.engormix.com/espectroscopia\\_infrarrojo\\_cercano\\_nirs\\_articulos\\_577\\_BAL.htm](http://www.engormix.com/espectroscopia_infrarrojo_cercano_nirs_articulos_577_BAL.htm). [ Noviembre 2007]
45. <http://www.montes.upm.es/Dptos/DptoIngForestal/OperacionesBasicas/Docencia/PDF/Temas/TEMA9.pdf> [Noviembre 2007]
46. [http://biblioteca.universia.net/html\\_bura/ficha/params/id/19548.html](http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/id/19548.html) [Octubre2007]
47. <http://www.tdx.cesca.es/TDX-0214103-224454/>. [Octubre 2007]

## PATENTE Y MANUAL SOFTWARE

48. Patente USP 3,973,027
49. Vision, 3,1,0,0 User Manual Foss Nirsystem. Silverspring, USA, 1998

**ANEXO 1****PREPARACION DE PLACEBO**

<b>Materia prima</b>	<b>Placebo al 100%</b>
Clonixinato de lisina	2.5g
Alcohol bencílico	0.5ml
Metabisulfito de sodio	0.20g
Propilenglicol	24 ml
Alcohol etílico	10 g
Agua inyectable cbp	50ml

**Procedimiento**

1. Medir en una probeta graduada los cosolventes (propilenglicol, alcohol etílico y alcohol bencílico)
2. Colocar los cosolventes en un vaso de precipitado de 250ml
3. Agitar por tres minutos en el ultraturax
4. Adicionar la cantidad de clonixinato de lisina
5. Agitar por 5 min y registrar la temperatura
6. En un vaso de precipitado disolver el metabisulfito de sodio en 5 ml de agua desionizada
7. Agregar la solución de metabisulfito de sodio a vaso de precipitado que contiene el clonixinato de lisina.; adicionarlo muy lentamente y por las paredes del recipiente
8. Agitar por 10 minutos y registrar la temperatura
9. Transferir la solución a un matraz volumétrico de 50 ml
10. Agregar agua desionizada poco a poco e ir agitando para homogenizar y permitir la solvatación del agua y los cosolventes.
11. Llevar a la marca de aforo con agua desionizada, cuidando que la solución del matraz se mantenga a una temperatura de 25°C.
12. Transferir nuevamente la solución a un vaso de precipitado y agitar por 4 minutos, cuidando que la temperatura se mantenga a 25°C.

## ANEXO 2

## FÓRMULAS PARA ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Media Aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coeficiente de variación

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

Pendiente

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Ordenada al origen

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coeficiente de determinación

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

$$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$$

$t_{0.975, n-2}$  = Referirse al anexo 19 para determinar el valor de la t de Student.

Intervalo de confianza para la media poblacional

$$IC(\mu) = y \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$t_{0.975, n-1}$  Referirse al anexo 19 para determinar el valor de t de Student  
n = número de recobros.

Intervalo de confianza para la ordenada al origen

$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_0}$$

$$S_{b_0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x)^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Coefficiente de variación de regresión

$$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} \times 100$$

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

### FÓRMULAS PARA ANÁLISIS DEL MODELO

PRESS (*predicted Residual Error Sum of Squares*)

$$\sum (\hat{y} - y)^2$$

$\hat{y}$  = Concentración calculada

Y = concentración del analito

MS<sub>regr</sub> (*Mean square for regression*)

$$\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N + 1}$$

SEP (*standard error of prediction*)

$$\left[ \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i - bias)^2}{N - 1} \right]^{1/2}$$

$$bias = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)}{N}$$

RMSEP (*Root Mean Square Error of prediction*)

$$\left[ \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N} \right]^{1/2}$$

SEP (*standard error of calibration*)

$$\left[ \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - K - 1} \right]^{1/2}$$

RMSEC (*Root Mean Squared Error of calibration*): Es el cálculo de RMSE para las muestras de calibración

RSEP (*Relative standard Error of prediction*) para la capacidad predictiva

$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^M (\hat{y}_{ij} - y_{ij})^2}{\sum_{i=1}^M y_{ij}^2}}$$

## FÓRMULAS COMPARACIÓN DE 2 MÉTODOS ANALITICOS

Variación del método 1.

$$S_{12} = \frac{n_1 \sum y_{12} - (\sum y_1)^2}{n_1(n_1 - 1)}$$

Variación del método 2.

$$S_2^2 = \frac{n_2 \sum y_2^2 - (\sum y_2)^2}{n_2(n_2 - 1)}$$

$S_1^2 =$  variancia menor  
 $S_2^2 =$  variancia mayor

Intervalo de confianza para la razón de variancias.

$$\frac{S_2^2}{S_1^2} \times F_{0.025, n_2 - 1, n_1 - 1} \leq \frac{\sigma_2^2}{\sigma_1^2} \leq \frac{S_2^2}{S_1^2} \times F_{0.975, n_2 - 1, n_1 - 1}$$

$n_1 =$  número de recobros del método de variancia menor  
 $n_2 =$  número de recobros del método de variancia mayor

- IGUAL REPETIBILIDAD: Las variancias son iguales; en el intervalo de confianza incluye la unidad

Media aritmética del método 1.

$$y_1 = \frac{\sum y_1}{n_1}$$

Media aritmética del método 2.

$$y_2 = \frac{\sum y_2}{n_2}$$

Intervalo de confianza para la diferencia de 2 medias poblacionales.

$$IC(\mu_1 - \mu_2) = (\bar{y}_1 - \bar{y}_2) \pm t_{0.975, n_1 + n_2 - 2} \sqrt{\frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \left[ \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right]}$$

- DIFERENTE REPETIBILIDAD (VARIANCIAS DIFERENTES):

Intervalo de confianza para la diferencia de 2 medias poblacionales.

$$IC(\mu_1 - \mu_2) = (\bar{y}_1 - \bar{y}_2) \pm t_{0.975, gl.} \sqrt{\frac{S_1^2 - S_2^2}{n_1 \dots n_2}}$$

### COMPARACIÓN DE LA PENDIENTE

Desviación estándar de regresión

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y_1^2 - b_{11} \sum xy_1 - b_{01} \sum y_1 + \sum y_2^2 - b_{12} \sum xy_2 - b_{02} \sum y_2}{n_1 + n_2 - 4}}$$

$$S_{b_{11} - b_{12}} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x_1^2 - \frac{(\sum x_1)^2}{n_1}} + \frac{1}{\sum x_2^2 - \frac{(\sum x_2)^2}{n_2}}}$$

$$IC(\beta_{11} - \beta_{12}) = (b_{11} - b_{12}) \pm t_{0.975, n_1 + n_2 - 4} S_{b_{11} - b_{12}}$$

### COMPARACIÓN DE LA ORDENADA AL ORIGEN

$$IC(\beta_{01} - \beta_{02}) = (b_{01} - b_{02}) \pm t_{0.975, n_1 + n_2 - 4} S_{b_{01} - b_{02}}$$

$$S_{b_{01} - b_{02}} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2} + \frac{(x_1)^2}{\sum x_1^2 - \frac{(\sum x_1)^2}{n_1}} + \frac{(x_2)^2}{\sum x_2^2 - \frac{(\sum x_2)^2}{n_2}}}$$

## ANEXO 3

## FOSS NIRSystems

# NEAR-INFRARED ABSORPTIONS

MAJOR ANALYTICAL BANDS AND THEIR RELATIVE PEAK POSITIONS

