



FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Tesis de Doctorado

Control de Calidad Quimiométrico de Formulaciones Farmacéuticas

Presentada por

Rubén Mariano Maggio

ÁREA ANÁLISIS DE MEDICAMENTOS



INSTITUTO DE QUÍMICA ROSARIO (IQUIR, CONICET – UNR)

Rosario, Argentina

≈ 2008 ≈

***Control de Calidad Quimiométrico
de Formulaciones Farmacéuticas***

***Rubén M. Maggio
Farmacéutico, UNR***

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Químicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Área Análisis de Medicamentos, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas y el Instituto de Química Rosario, durante el período comprendido entre Abril de 2005 y Noviembre de 2008, bajo la dirección del Dr. Teodoro S. Kaufman y la Co-dirección de la Dra. Patricia M. Castellano.

A mis Padres
A mis hermanos
A Laura, mi compañera

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer enormemente a las siguientes personas y entidades que me han ayudado durante la realización de este trabajo:

Al Dr. Teodoro S. Kaufman, por haberme aceptado en su grupo de trabajo, por haber sabido guiarme de forma precisa en todo momento y por el tiempo dedicado a la realización de este trabajo de Tesis.

A la Dra. Patricia M. Castellano por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Por el esfuerzo empleado en el trabajo de mesada, por compartir su experiencia, por su ayuda y tolerancia.

A las Farmacéuticas Alejandra Operto, Silvana Vignaduzzo y Romina Bianchini, por las charlas compartidas durante estos años, por los mates y su grata compañía en todo momento.

A los integrantes del Área Química Analítica, por compartir su tiempo y trabajo en el área docente así como sus conocimientos en el área científica.

A las Farmacias y a los diferentes Laboratorios de Especialidades Medicinales, que gentilmente donaron cápsulas, principios activos y especialidades farmacéuticas necesarias para desarrollar los diversos trabajos experimentales de esta Tesis.

Al Consorzio Interuniversitario Italiano per l'Argentina (CUIA) por otorgarme el premio de estudio que me permitió realizar una breve pero fructífera estadía en Italia.

A los Profesores Dario Compagnone y Michele Del Carlo, por albergarme en su Laboratorio de La Università degli Studi di Teramo, en Mosciano (Teramo, Italia).

Por último, agradezco a la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario, al Instituto de Química Rosario (IQUIR), y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la ayuda brindada, y por permitirme el acceso a equipos y el uso de reactivos e instalaciones.

ÍNDICE GENERAL

Ítem	Contenido	Página
	ÍNDICE GENERAL	<i>i</i>
	ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	<i>x</i>
	PUBLICACIONES ORIGINADAS EN ESTE TRABAJO DE TESIS	<i>xv</i>
	COMUNICACIONES A CONGRESO FRUTO DE ESTE TRABAJO DE TESIS	<i>xvi</i>
	CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
I.1.	CALIDAD Y CONTROL DE CALIDAD	1
I.2.	LOS MEDICAMENTOS	6
I.2.1.	Formas Farmacéuticas Sólidas de Administración Oral	7
<i>I.2.1.1.</i>	<i>Comprimidos</i>	8
<i>I.2.1.2.</i>	<i>Cápsulas</i>	10
I.2.2.	Liberación del Principio Activo a Partir de FFS	10
<i>I.2.2.1.</i>	<i>Equivalencia</i>	11
I.3.	CONTROL DE CALIDAD DE MEDICAMENTOS	11
I.3.1.	Criterios de Calidad de los Medicamentos	11
<i>I.3.1.1.</i>	<i>Especificaciones y ensayos de identidad</i>	12
<i>I.3.1.2.</i>	<i>Especificaciones y ensayos de pureza</i>	12
<i>I.3.1.3.</i>	<i>Especificaciones y ensayos de riqueza</i>	13
<i>I.3.1.4.</i>	<i>Especificaciones y ensayos de acción de las distintas formas farmacéuticas</i>	14
<i>I.3.1.5.</i>	<i>El ensayo de disolución y la “similitud” entre lotes</i>	15
	<i>I.3.1.5.A. Enfoque modelo-independiente utilizando los factores de similitud y diferencia</i>	16
	<i>I.3.1.5.B. Enfoque modelo-independiente utilizando una región de certeza multivariada</i>	17
	<i>I.3.1.5.C. Enfoques modelo-dependientes</i>	18
	<i>I.3.1.5.D. Enfoque basado en el análisis de la variancia (ANOVA)</i>	19
<i>I.3.1.6.</i>	<i>Recursos analíticos para verificar el cumplimiento de las especificaciones</i>	21

Ítem	Contenido	Página
I.4.	VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	23
I.4.1.	Atributos Analíticos	25
<i>I.4.1.1.</i>	<i>Exactitud</i>	25
<i>I.4.1.2.</i>	<i>Precisión</i>	26
<i>I.4.1.3.</i>	<i>Especificidad</i>	27
<i>I.4.1.4.</i>	<i>Límite de detección</i>	28
<i>I.4.1.5.</i>	<i>Límite de cuantificación</i>	29
<i>I.4.1.6.</i>	<i>Linealidad e intervalo</i>	29
<i>I.4.1.7.</i>	<i>Robustez</i>	30
I.5.	QUIMIOMETRÍA	31
I.5.1.	Técnicas Quimiométricas de Clasificación	31
<i>I.5.1.1.</i>	<i>Métodos no supervisados</i>	32
<i>I.5.1.2.</i>	<i>Métodos supervisados</i>	32
I.5.2.	Técnicas de Reducción de la Dimensionalidad	33
<i>I.5.2.1.</i>	<i>Tratamiento previo de los datos</i>	34
<i>I.5.2.2.</i>	<i>Análisis de componentes principales (PCA)</i>	35
<i>I.5.2.3.</i>	<i>Redes neuronales de Kohonen – Mapas auto-organizables</i>	37
I.5.3.	Técnicas Quimiométricas para el Análisis Cuantitativo	39
<i>I.5.3.1.</i>	<i>Espectrofotometría de derivadas</i>	40
<i>I.5.3.2.</i>	<i>Calibración multivariada</i>	42
	<i>I.5.3.2.A. Método de cuadrados mínimos parciales (PLS)</i>	44
	<i>I.5.3.2.A.1. Validación interna y optimización para un modelo PLS</i>	47
	<i>I.5.3.2.A.2. Cifras de mérito</i>	51
	<i>I.5.3.2.A.3. Muestras discordantes (Outliers)</i>	52
	<i>I.5.3.2.A.4. Pre-procesamiento de datos en PLS</i>	53
	<i>I.5.3.2.A.5. Selección de variables</i>	53
	<i>I.5.3.2.A.6. Diseños experimentales</i>	54
	<i>I.5.3.2.B. Método de regresión sobre componentes principales (PCR)</i>	58
I.6.	PRODUCTOS DE INTERÉS FARMACÉUTICO OBJETOS DE ESTUDIO	60
I.6.1.	Acetaminofeno y Diclofenaco	60
I.6.2.	Clorhidrato de Pseudoefedrina y Clorhidrato de Fexofenadina	61
I.6.3.	Hidroclorotiazida y Losartán Potásico	62

Ítem	Contenido	Página
I.6.4.	Hidroclorotiazida y Clorhidrato de Propranolol	63
I.6.5.	Furosemida	63
<i>I.6.5.1.</i>	<i>Polimorfismo cristalino</i>	65
I.6.6.	Aceite de Oliva	66
<i>I.6.6.1.</i>	<i>Ácidos grasos e índice de peróxidos</i>	66
<i>I.6.6.2.</i>	<i>Compuestos antioxidantes</i>	68
	CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	71
II.1.	MATERIALES PARA EL DESARROLLO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS CUANTITATIVOS EN EL UV	71
II.1.1.	Principios Activos Puros y Especialidades Farmacéuticas Comerciales Utilizados	71
<i>II.1.1.1.</i>	<i>Principios activos utilizados</i>	71
<i>II.1.1.2.</i>	<i>Especialidades farmacéuticas comerciales utilizadas</i>	72
II.1.2.	Reactivos, Soluciones Madre, Diluciones y Soluciones de Trabajo	74
<i>II.1.2.1.</i>	<i>Soluciones de Diclofenaco Sódico y Acetaminofeno</i>	74
	<i>II.1.2.1.A. Soluciones para PLS</i>	74
	<i>II.1.2.1.B. Soluciones para CLAE</i>	75
<i>II.1.2.2.</i>	<i>Soluciones de Clorhidrato de Pseudoefedrina y Clorhidrato de Fexofenadina</i>	76
	<i>II.1.2.2.A. Soluciones para PLS</i>	76
	<i>II.1.2.2.B. Soluciones para DRE</i>	77
	<i>II.1.2.2.C. Soluciones para CLAE</i>	78
<i>II.1.2.3.</i>	<i>Soluciones de Hidroclorotiazida y Clorhidrato de Propranolol</i>	78
	<i>II.1.2.3.A. Soluciones para PLS</i>	78
	<i>II.1.2.3.B. Soluciones para DRE</i>	79
	<i>II.1.2.3.C. Soluciones para CLAE</i>	80
<i>II.1.2.4.</i>	<i>Soluciones de Hidroclorotiazida y Losartán Potásico</i>	81
	<i>II.1.2.4.A. Soluciones para PLS</i>	81
	<i>II.1.2.4.B. Soluciones para CLAE</i>	82
II.1.3.	Equipamiento Utilizado para el Desarrollo de Métodos Quimiométricos Cuantitativos en el UV. Condiciones de Trabajo	83
<i>II.1.3.1.</i>	<i>Espectroscopia de absorción electrónica</i>	83

Ítem	Contenido	Página
II.1.3.2.	<i>Cromatografía líquida de alta eficiencia</i>	83
	<i>II.1.3.2.A. Acetaminofeno y Diclofenaco Sódico</i>	83
	<i>II.1.3.2.B. Clorhidrato de Pseudoefedrina y Clorhidrato de Fexofenadina</i>	84
	<i>II.1.3.2.C. Clorhidrato de Propranolol e Hidroclorotiazida</i>	84
	<i>II.1.3.2.D. Losartán Potásico e Hidroclorotiazida</i>	85
II.1.3.3.	<i>Ensayos de disolución</i>	85
II.1.3.4.	<i>Centrifugaciones y agitación</i>	85
II.1.3.5.	<i>Pesadas</i>	85
II.2.	METODOLOGÍAS COMPUTACIONALES EMPLEADAS PARA EL DESARROLLO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS CUANTITATIVOS EN EL UV	86
II.2.1.	Procesamiento Computacional de Datos Espectrales	86
II.2.2.	Métodos Quimiométricos y Estadísticos - Software	86
II.2.3.	Gráficos - Software	86
II.3.	ESTUDIOS SOBRE EL PERFIL DE DISOLUCIÓN DE FÁRMACOS	87
II.3.1.	Equipamiento	87
II.3.2.	Métodos Quimiométricos, Estadísticos y Gráficos - Software	87
II.3.3.	Muestras para la Clasificación de Comprimidos Según su Perfil de Disolución	88
II.3.3.1.	<i>Furosemida</i>	88
II.3.3.2.	<i>Acetaminofeno</i>	88
II.4.	ESTUDIOS SOBRE DISOLUCIÓN Y POLIMORFISMO CRISTALINO	89
II.4.1.	Equipamiento	89
II.4.2.	Métodos Quimiométricos - Software	89
II.4.3.	Muestras para el Estudio del Polimorfismo Cristalino	90
II.4.4.	Perfiles de Disolución	90
II.5.	ANÁLISIS DE CARACTERES DE CALIDAD DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN	91
II.5.1.	Muestras	91
II.5.2.	Instrumentación y Adquisición de Espectros	91
II.5.3.	Pre-procesamiento de Datos y Modelos de Calibración	92
II.5.4.	Métodos Analíticos de Referencia	92

Ítem	Contenido	Página
II.6.	ANÁLISIS DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN	93
II.6.1.	Sustancias de Referencia	93
II.6.2.	Soluciones Madre, Diluciones, Soluciones de Trabajo y Reactivos	93
II.6.3.	Voltametría Diferencial de Pulso	94
II.6.4.	Procesamiento Computacional de Datos Voltamétricos	94
	CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	95
III.1.	DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE DICLOFENACO SÓDICO Y ACETAMINOFENO EN COMPRIMIDOS COMERCIALES	95
III.1.1.	El Problema Analítico	95
III.1.2.	Diseño del Conjunto de Calibración y Optimización de los Parámetros Estadísticos	97
III.1.3.	Validación del Método Mediante el Uso de Muestras Sintéticas	99
III.1.4.	Aplicación del Método Propuesto a Productos Farmacéuticos Comerciales. Control de Uniformidad de Dosis	101
III.1.5.	Aplicación del Método Propuesto a Productos Farmacéuticos Comerciales. Preparación de Perfiles de Disolución.	103
III.1.6.	Conclusiones	105
III.2.	DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE CLORHIDRATO DE PSEUDOFEDRINA Y CLORHIDRATO DE FEXOFENADINA EN MEZCLAS BINARIAS MEDIANTE ANÁLISIS MULTIVARIADO. COMPARACIÓN CON CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA	106
III.2.1.	El Problema Analítico	106
III.2.2.	Selección del Intervalo de Longitudes de Onda de Trabajo	107
III.2.3.	Diseño del Conjunto de Calibración y Optimización de los Parámetros Estadísticos	108
III.2.4.	Validación del Método Mediante el Uso de Muestras Sintéticas	111
III.2.5.	Aplicación del Método Propuesto a Productos Farmacéuticos Comerciales. Comparación con Otras Metodologías	113
III.2.6.	Conclusiones	122
III.3.	DESARROLLO DE MÉTODOS UV-PLS, UV-PCR Y DERIVADA DE LA RAZÓN ESPECTRAL PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE HIDROCLOROTIAZIDA Y CLORHIDRATO DE PROPRANOLOL EN COMPRIMIDOS COMERCIALES	124

Ítem	Contenido	Página
III.3.1.	El Problema Analítico	124
III.3.2.	Diseño del Conjunto de Calibración y Optimización de Parámetros Estadísticos de la Calibración PLS	127
III.3.3.	Validación de los Métodos UV-PLS y UV-PCR Mediante el Uso de Muestras Sintéticas	130
III.3.4.	Diseño del Conjunto de Calibración, Optimización de Parámetros Estadísticos de la Calibración y Validación del Método DRE	131
III.3.5.	Aplicación de los Métodos Propuestos	134
<i>III.3.5.1.</i>	<i>Control de dosis de productos farmacéuticos</i>	135
<i>III.3.5.2.</i>	<i>Ensayo de disolución de productos farmacéuticos conteniendo HCT y PRO</i>	136
<i>III.3.5.3.</i>	<i>Preparación de perfiles de disolución</i>	137
III.3.6.	Conclusiones	137
III.4.	DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE HIDROCLOROTIAZIDA Y LOSARTÁN POTÁSICO EN MEZCLAS BINARIAS MEDIANTE ANÁLISIS MULTIVARIADO. COMPARACIÓN CON CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA	139
III.4.1.	El Problema Analítico	139
III.4.2.	Diseño del Conjunto de Calibración. Optimización de Parámetros Estadísticos de la Calibración	142
III.4.3.	Validación del Método Mediante el Uso de Muestras Sintéticas	145
III.4.4.	Aplicación del Método Propuesto a Productos Farmacéuticos Comerciales	147
III.4.5.	Conclusiones	152
III.5.	UTILIZACIÓN DE METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES PARA DETERMINAR LA SIMILITUD DE PERFILES DE DISOLUCIÓN	154
III.5.1.	El Problema Analítico	154
III.5.2.	Diseño del Modelo y Optimización de Parámetros del Entrenamiento para PCA	156
III.5.3.	Datos de Perfiles de Disolución	159
<i>III.5.3.1.</i>	<i>Datos Experimentales</i>	159
<i>III.5.3.1.A.</i>	<i>Furosemida</i>	159
<i>III.5.3.1.B.</i>	<i>Acetaminofeno</i>	159
<i>III.5.3.1.C.</i>	<i>Datos provenientes de la literatura</i>	160

Ítem	Contenido	Página
III.5.4.	Análisis de los Perfiles. Comparación Entre Métodos Basados en f_1 y f_2 y PCA-CR	160
<i>III.5.4.1.</i>	<i>El método PCA-CR</i>	160
	<i>III.5.4.1.A. Selección del número óptimo de PCs para implementar PCA-CR</i>	162
	<i>III.5.4.1.B. Obtención de la región $f_2 \leq 50$</i>	163
<i>III.5.4.2.</i>	<i>Disolución de comprimidos de Furosemida. Comparación de perfiles entre y dentro de las marcas</i>	164
<i>III.5.4.3.</i>	<i>Disolución de comprimidos de Acetaminofeno. Comparación entre marcas.</i>	170
<i>III.5.4.4.</i>	<i>Datos de disolución de Tsong y Hammerstrom</i>	172
<i>III.5.4.5.</i>	<i>Datos de disolución de pre y post-cambio de Sha y col. (1998)</i>	175
III.5.5.	Conclusiones	178
III.6.	APLICACIÓN DEL MÉTODO PCA-CR Y USO DE MAPAS AUTO-ORGANIZABLES PARA DETERMINAR LA IDENTIDAD DE POLIMORFOS EN FORMAS FARMACÉUTICAS SÓLIDAS	180
III.6.1.	Generalidades	180
III.6.2.	El Problema Analítico	181
III.6.3.	Caracterización de los Polimorfos	182
III.6.4.	Disolución de Cápsulas Conteniendo los Diferentes Polimorfos	184
III.6.5.	Caracterización de los Polimorfos Mediante PCA-CR	185
III.6.6.	Clasificación de los Polimorfos Mediante el Uso de SOM	189
III.6.7.	Conclusiones	191
III.7	DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE NUEVOS MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS PARA LA CARACTERIZACIÓN Y EL CONTROL DE CALIDAD DE ACEITE DE OLIVA VIRGEN MEDIANTE ESPECTROSCOPIA EN EL INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER	192
III.7.1.	El Problema Analítico	192
III.7.2.	Objetivos Analíticos	193
III.7.3.	Corrección y Pre-tratamiento de Datos Espectrales FTIR	194
III.7.4.	Modelos PLS para el Perfil de TFA	195
III.7.5.	Modelo PLS para la Determinación de PV	199
III.7.6.	Conclusiones	200

Ítem	Contenido	Página
III.8.	DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS ELECTROQUÍMICOS QUIMIOMÉTRICAMENTE ASISTIDOS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ANTI-OXIDANTES EN EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN. ESTUDIOS PRELIMINARES	202
III.8.1.	El Problema Analítico	202
III.8.2.	Optimización de las Condiciones de Medida Electroquímica	206
III.8.3.	Diseño del Conjunto de Calibración. Optimización de Parámetros Estadísticos de la Calibración	206
III.8.4.	Validación del Método Mediante el Uso de Muestras Sintéticas	210
III.8.5.	Conclusiones	211
	CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES FINALES	213
	CAPÍTULO V: RESUMEN	221
V.1.	MÉTODOS CUANTITATIVOS PARA MEZCLAS BINARIAS	222
V.1.1.	Acetaminofeno y Diclofenaco	223
V.1.2.	Clorhidrato de Pseudoefedrina y Clorhidrato de Fexofenadina	223
V.1.3.	Hidroclorotiazida y Losartán Potásico	224
V.1.4.	Hidroclorotiazida y Clorhidrato de Propranolol	225
V.2.	PERFILES DE DISOLUCIÓN Y CALIDAD	226
V.2.1.	Comparación de Perfiles de Disolución	226
V.2.2.	Calificación de Polimorfos de Furosemida	227
V.3.	ESTUDIOS QUIMIOMÉTRICOS SOBRE ACEITE DE OLIVA VIRGEN	228
V.3.1.	Perfil de Ácidos Grasos e Índice de Peróxidos	228
V.3.2.	Compuestos Antioxidantes	229
	CHAPTER V: ABSTRACT	232
	CAPÍTULO VI: ANEXOS	243
VI.1.	RUTINA DE CONVERSIÓN DE DATOS ADQUIRIDOS MEDIANTE EL USO DE DIVERSOS INSTRUMENTOS EN MATRICES, APTAS PARA SU MANIPULACIÓN POR PLS O PCR	243

Ítem	Contenido	Página
VI.2.	RUTINA DE CONVERSIÓN DE DATOS ADQUIRIDOS MEDIANTE EL USO DEL ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS SHIMADZU 1650 EN MATRICES ESPECTRALES, Y OPCIONALMENTE DE CONCENTRACIÓN, APTAS PARA SU MANIPULACIÓN POR PLS O PCR	245
VI.3.	RUTINA DE ELIMINACIÓN DE DATOS EN MATRICES ESPECTRALES Y VECTORES DE CONCENTRACIÓN. FUNCIÓN SATÉLITE DE LA RUTINA DE CONVERSIÓN DE DATOS ADQUIRIDOS	258
VI.4.	RUTINA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS BASADA EN LA ESTADÍSTICA “ <i>t</i> ” DE STUDENT	259
VI.5.	RUTINA MADRE DE PCA-CR PARA LA COMPARACIÓN DE MATRICES DE PERFILES DE DISOLUCIÓN DE DOS LOTES DE COMPRIMIDOS	260
VI.6.	RUTINA DE CÁLCULO DE LA ELIPSE DE CONFIANZA BASADA EN LA ESTADÍSTICA CHI CUADRADO. RUTINA SATÉLITE DE PCA-CR	262
VI.7.	RUTINA DE CÁLCULO DE ELIPSES EN 2D Y 3D. RUTINA SATÉLITE DEL CÁLCULO DE LA ELIPSE DE CONFIANZA BASADA EN LA ESTADÍSTICA CHI CUADRADO	264
VI.8.	RUTINA DE CÁLCULO REGIONES DE <i>BOOTSPTRAPPING</i> $f_2= 50$ PARA PERFILES DE DISOLUCIÓN	267
VI.9.	RUTINA PARA EL CÁLCULO DEL NÚMERO ÓPTIMO DE PCs QUE REPRESENTAN UN PERFIL DE DISOLUCIÓN	270
	CAPÍTULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS SELECTAS	273

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<i>Abreviatura/Símbolo</i>	<i>Significado</i>
ACE	Acetaminofeno (sinonimia: Paracetamol)
ACN	Acetonitrilo
ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
ANOVA	Análisis de la Variancia (del inglés, <i>Analysis of the Variance</i>)
ASCII	Código Norteamericano Estándar para el Intercambio de Información (del inglés, <i>American Standard Code for Information Interchange</i>)
ATR	Reflectancia Total Atenuada (del inglés, <i>Attenuated Total Reflectance</i>)
ATR-FTIR	Espectroscopia en el Infrarrojo con Transformada de Fourier – Técnica de Reflectancia Total Atenuada (del inglés, <i>Attenuated Total Reflectance –Fourier Transformed Infrared Spectroscopy</i>)
AUC	Área Bajo la Curva (del inglés, <i>Area Under the Curve</i>)
BMU	Unidad con el Mejor Parecido (del inglés, <i>Best Matching Unit</i>)
BPFyC	Buenas Prácticas de Fabricación y Control (en inglés, GMP, <i>Good Manufacturing Practices</i>)
c.s.	Cantidad Suficiente
CCD	Cromatografía en Capa Delgada (en inglés, TLC, <i>Thin Layer Chromatography</i>)
cGC-FID	Cromatografía Capilar de Gases con Detección por Ionización de la Llama (del inglés, <i>Capillary Gas Chromatography-Flame Ionization Detection</i>)
CLAE	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (en inglés, HPLC, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
cm	Centímetro o Centimetro
CV, CV(%)	Coefficiente de Variación (porcentual)
D ⁿ	Derivada Espectral de Orden n (n= 0 en el espectro normal)

<i>Abreviatura/Símbolo</i>	<i>Significado</i>
DAINE	Droga Anti-inflamatoria no Esteroidea
DCC	Diseño Central Compuesto (en inglés, CCD, <i>Central Composite Design</i>)
DEM	Distancia Estadística Multivariada (en inglés, MSD, <i>Multivariate Statistical Distance</i>)
DIC	Diclofenaco
DPV	Potenciometría Diferencial de Pulso (del inglés, <i>Differential Pulse Voltammetry</i>)
DRE	Derivada de la Razón Espectral
FA	Farmacopea Argentina
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (del inglés, <i>Food and Drug Administration</i>)
FEX	Clorhidrato de Fexofenadina
FFS	Forma(s) Farmacéutica(s) Sólida(s)
FTIR	Espectroscopia en el Infrarrojo con Transformada de Fourier
FUR	Furosemida
GC	Cromatografía de Gases (del inglés, <i>Gas Chromatography</i>)
GC-MS	Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (del inglés, <i>Gas-Chromatography Mass Spectrometry</i>)
h	Hora(s)
HCT	Hidroclorotiazida
HPTLC	Cromatografía en Capa Delgada de alta eficiencia (del inglés, <i>High Performance Thin Layer Chromatography</i>)
HTSL	Hidroxitirosol
ICH	Conferencia Internacional de Armonización (del inglés, <i>International Conference on Harmonisation</i>)
INT	Intensidad de la Señal (en DRE)
IR	Infrarrojo (particularmente infrarrojo medio)
ISO	Organización Internacional de Estandarización (del inglés, <i>International Standardization Organization</i>)

Abreviatura/Símbolo	Significado
L	Litro(s)
LOD	Límite de Detección (del inglés, <i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Límite de Cuantificación (del inglés, <i>Limit of Quantitation</i>)
LST	Losartán Potásico
LV	Variable Latente (del inglés, <i>Latent Variable</i>)
M	Concentración Molar, Molaridad
MCD	Mínima Diferencia de Concentración Detectable
MD	Distancia de Mahalanobis (del inglés, <i>Mahalanobis Distance</i>)
MeOH	Metanol
meqO ₂	Miliequivalentes de Oxígeno
mg	Miligramo(s)
min	Minuto(s)
mL	Mililitro(s)
mm	Milímetro(s)
MRP	Métodos de Reconocimiento de Pautas (en inglés, PRM, <i>Pattern Recognition Methods</i>)
MUFA	Ácidos Grasos Mono-Insaturados (del inglés, <i>Mono-unsaturated Fatty Acids</i>)
N	Número de Muestras
nm	Nanometro o Nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud (en inglés, WHO, <i>World Health Organization</i>)
PA	Pro-Análisis
PC	Componente Principal (del inglés, <i>Principal Component</i>)
PCA	Análisis de Componentes Principales (del inglés, <i>Principal Component Analysis</i>)

<i>Abreviatura/Símbolo</i>	<i>Significado</i>
PCR	Regresión sobre Componentes Principales (del inglés, <i>Principal Components Regression</i>)
PEF	Clorhidrato de Pseudoefedrina
PLS	Cuadrados Mínimos Parciales (del inglés, <i>Partial Least Squares</i>)
ppm	Partes por Millón
PRESS	Sumatoria de Cuadrados del Error Residual en la Predicción (del inglés, <i>Prediction Residual Error Sum of Squares</i>)
PRO	Clorhidrato de Propranolol
PUFA	Ácidos Grasos Poli-Insaturados (del inglés, <i>Poly-Unsaturated Fatty Acids</i>)
PV	Índice de Peróxidos (del inglés, <i>Peroxide Value</i>)
REC (%)	Error Relativo Porcentual de la Calibración (del inglés, <i>Relative Error of Prediction</i>)
REP (%)	Error Relativo Porcentual de la Predicción (del inglés, <i>Relative Error of Prediction</i>)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMSD	Raíz Cuadrada del Promedio de las Diferencias al Cuadrado (del inglés, <i>Root Mean Squared Difference</i>)
rpm	Revoluciones por Minuto
RSD	Desviación Estándar Relativa (del inglés, <i>Relative Standard Deviation</i>)
SCFC	Cromatografía de Fluidos Supercríticos (del inglés, <i>Supercritical Fluid Chromatography</i>)
SD	Desviación Estándar (del inglés, <i>Standard Deviation</i>)
SEL	Selectividad
SEN	Sensibilidad
SOM	Mapas Auto-Organizables (del inglés, <i>Self Organizing Maps</i>)
SVD	Descomposición en Valores Singulares (del inglés, <i>Singular Value Decomposition</i>)
TFA	Ácidos Grasos Totales (del inglés, <i>Total Fatty Acids</i>)

<i>Abreviatura/Símbolo</i>	<i>Significado</i>
TOC	α -Tocoferol
USP	Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (del inglés, <i>United States Pharmacopoeia</i>)
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
V	Voltio(s)
v.	Versión (de un dado aplicativo)
v/v	Volumen en Volumen
VOO	Aceite de Oliva Virgen (del inglés, <i>Virgin Olive Oil</i>)
®, TM	Marca Registrada (como supraíndices)
λ	Longitud de Onda
λ_{\max}	Longitud de Onda del Máximo de Absorción

ESTE TRABAJO DE TESIS DIO LUGAR A LAS SIGUIENTES PUBLICACIONES:

1. "A chemometric method for the simultaneous determination of acetaminophen and diclofenac in pharmaceutical preparations". Silvana E. Vignaduzzo, Patricia M. Castellano, Rubén M. Maggio y Teodoro S. Kaufman. *Anal. Bioanal. Chem.* **382**, 1711-1714 (2005).
2. "PLS and first derivative of ratio spectra method for the determination of hydrochlorothiazide and propranolol hydrochloride in tablets". Silvana E. Vignaduzzo, Patricia M. Castellano, Rubén M. Maggio y Teodoro S. Kaufman. *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 2239-2244 (2006).
3. "Alternative and improved method for the simultaneous determination of fexofenadine and pseudoephedrine in their combined tablet formulation". Rubén M. Maggio, Patricia M. Castellano, Silvana E. Vignaduzzo y Teodoro S. Kaufman. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **45**, 804-810 (2007).
4. "A new principal component analysis-based approach for testing similarity of drug dissolution profiles". Rubén M. Maggio, Patricia M. Castellano y Teodoro S. Kaufman. *Eur. J. Pharm. Sci.* **34**, 66-77 (2008).
5. "A multivariate approach for the simultaneous determination of losartan potassium and hydrochlorothiazide in a combined pharmaceutical tablet formulation". Rubén M. Maggio, Patricia M. Castellano y Teodoro S. Kaufman. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 2949–2955 (2008).
6. "Monitoring of virgin olive oil fatty acid composition by Fourier transformed infrared spectroscopy coupled with partial least squares". Rubén M. Maggio, Teodoro S. Kaufman, Michele Del Carlo, Lorenzo Cerretani, Alessandra Bendini, Angelo Michelli y Dario Compagnone. *Food Chem.* En Prensa. doi:10.1016/j.foodchem.2008.11.029.

ESTE TRABAJO DE TESIS DIO LUGAR A LAS SIGUIENTES COMUNICACIONES A CONGRESOS:

1. “Desarrollo y aplicación de un eficiente y económico método alternativo para el control de calidad de comprimidos”. Rubén M. Maggio, Mónica C. F. Ferraro, Patricia M. Castellano y Teodoro S. Kaufman. XIII Jornadas de Jóvenes Investigadores de AUGM. San Miguel de Tucumán, 31/08 – 2/09/2005.
2. “Tres métodos quimiométricos para la determinación simultánea de hidroclorotiazida y clorhidrato de propranolol en comprimidos. Control de dosis y ensayo de disolución”. Rubén M. Maggio, Silvana E. Vignaduzzo, Patricia M. Castellano y Teodoro S. Kaufman. X Congreso Argentino de Farmacia y Bioquímica Industrial. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 5 – 9/11/2005.
3. “Desarrollo y validación de un método quimiométrico útil para el control de dosis de clorhidrato de fexofenadina y clorhidrato de pseudoefedrina”. Rubén M. Maggio, Silvana E. Vignaduzzo, Patricia M. Castellano y Teodoro S. Kaufman. III Congreso Argentino de Química Analítica. Merlo, San Luis, 1 – 4/11/2005.
4. “Método quimiométrico para el control de dosis y la elaboración de perfiles de disolución de comprimidos de hidroclorotiazida y losartán potásico”. Rubén M. Maggio, Silvana E. Vignaduzzo, Patricia M. Castellano y Teodoro S. Kaufman. IV Congreso y Exposición de Tecnología Farmacéutica ETIF 2006. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 24 – 25/10/2006.
5. “Determinación simultánea de hidroclorotiazida y losartán potásico en comprimidos por un método de calibración multivariada”. Rubén M. Maggio, Silvana E. Vignaduzzo, Patricia M. Castellano y Teodoro S. Kaufman. XXVI Congreso Argentino de Química. Ciudad de San Luis, 13 – 15/11/2006.
6. “Estudios preliminares de dos métodos quimiométricos para clasificar perfiles de disolución en medicamentos genéricos”. Rubén M. Maggio, Patricia M. Castellano y Teodoro S. Kaufman. XXVI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, 5 – 7/12/2006.

7. “Clasificación y calificación de perfiles de disolución en comprimidos genéricos mediante análisis de componentes principales”. Rubén M. Maggio, Patricia M. Castellano y Teodoro S. Kaufman. XI Congreso Argentino de Farmacia y Bioquímica Industrial. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 27 – 30/08/2007. *Trabajo seleccionado para ser presentado en forma oral.*
8. “Una estrategia quimiométrica para clasificación y calificación de comprimidos genéricos a partir de sus perfiles de disolución”. Rubén M. Maggio, Patricia M. Castellano y Teodoro S. Kaufman. II Congreso Iberoamericano y IV Congreso Argentino de Química Analítica. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 27 – 30/08/2007.
9. “Calibrazione attraverso partial least square (PLS-1) di misure FTIR per la determinazione di parametri di qualità dell’olio extravergine di oliva”. Lorenzo Cerretani, Rubén M. Maggio, Alessia Pepe, Michele Del Carlo, Angelo Cichelli y Dario Compagnone. VII Congresso Nazionale di Chimica degli Alimenti. Perugia (Italia), 23 – 26/06/2008.
10. “Desarrollo y validación de un método quimiométrico para el control de parámetros de calidad de aceite-extravirgen de Oliva”. Rubén M. Maggio, Michele Del Carlo, Lorenzo Cerretani, Dario Compagnone y Teodoro S. Kaufman, XXVII Congreso Argentino de Química. San Miguel de Tucumán, 17 – 19/09/2008.
11. “Determinación de la composición de ácidos grasos e índice de peróxido en aceite de oliva virgen mediante métodos quimiométricos”. Rubén M. Maggio, Michele Del Carlo, Dario Compagnone y Teodoro S. Kaufman. XV Jornadas de Jóvenes Investigadores de AUGM. Montevideo (Uruguay), 27 – 29/09/2008.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I:

INTRODUCCIÓN

I.1. CALIDAD Y CONTROL DE CALIDAD

La fuerte competitividad industrial que se vive actualmente ha revolucionado el concepto de producción, aumentando paralelamente la importancia que la calidad ya había tenido tradicionalmente y modificando su sentido. Actualmente, es común que la calidad de cualquier producto industrial se utilice como su sello de garantía. El cliente moderno busca que el producto que se dispone a comprar cumpla con una serie de especificaciones y que haya sido producido bajo controles que aseguren su calidad. Es por ello habitual oír hablar de calidad en todos los campos industriales, pero ¿qué se entiende por “calidad”?

Se pueden concebir diversas definiciones de calidad, las que dependen de diferentes perspectivas, incluyendo las del producto, de la producción, del usuario y del uso al que dicho producto estará destinado.

- **Punto de vista del producto**

En este caso, la calidad representa las diferencias cualitativas y cuantitativas de algún atributo requerido, contenidas en el producto; esto incluye las cantidades de las diversas propiedades no cuantificables en forma monetaria que contiene cada unidad de producto.

- **Perspectiva de la producción**

En este sentido, la calidad puede definirse como la conformidad del producto en relación con sus especificaciones; en consecuencia, a mejor grado de cumplimiento de las especificaciones, mayor será la calidad del producto.

- **Enfoque del usuario**

Teniendo en cuenta el usuario, la calidad implica la capacidad de satisfacer los deseos del consumidor. En este sentido, la calidad de un producto depende de cómo éste responda a las preferencias y necesidades del público como cliente.

En este mismo sentido, las normas ISO definen calidad como “la totalidad de rasgos y características de un producto, proceso o servicio que inciden en su capacidad de satisfacer necesidades reguladas o implícitas”.¹

Según esta definición, cuando se utiliza la expresión “de buena calidad” se pretende remarcar la excelencia de un producto o servicio y el cumplimiento de sus especificaciones, cualitativas o cuantitativas, acordadas previamente con el cliente y/o definidas por la autoridad competente.

- **Punto de vista de la utilidad o uso del producto**

Según este enfoque, promovido por el prestigioso especialista en temas de calidad Joseph M. Juran desde la tercera Edición de su obra sobre la materia,² la calidad de un producto puede definirse como su “idoneidad para el uso pretendido”.

En línea con la definición de Juran, para el caso específico de los productos de interés farmacéutico, una definición moderna de calidad es la que fuera enunciada inicialmente en la edición de 1977 de las Buenas Prácticas de Fabricación y Control, que señala a la calidad como “parte de la esencia de un objeto que comprende la totalidad de sus atributos y propiedades que hacen a su aptitud para el uso pretendido”.³

La definición de calidad basada en la aptitud para el uso propuesto presenta varias ventajas al ser aplicada a productos de interés farmacéutico, las que se detallan en la Tabla I.1.1. Resulta de interés que algunas definiciones agregan al concepto de *aptitud para el uso* la condición de *a un precio aceptable para el consumidor*. Sin embargo, como es bien conocido, en materia de salud las consideraciones económicas no son las mismas que para el resto de los bienes o los servicios.

Tabla I.1.1. Ventajas de la definición de calidad en términos de aptitud para el uso pretendido, cuando se aplica a los productos de interés farmacéutico.

-
- Es clara, concisa y de valor práctico.
 - No requiere la resolución de cuestiones referidas a *excelencia o superioridad*.
 - A diferencia de otros bienes y servicios, indirectamente hace referencia a que en aspectos de salud no existen *medicamentos superiores* o una *calidad extra*.
 - Requiere que los medicamentos *cumplan segura y eficientemente su objetivo*.
 - Refleja que en el caso de los medicamentos es esencial que sean lo que dicen, pretenden o representan ser.
 - Supera falencias de las definiciones relacionadas con las *necesidades del consumidor*, en el sentido que estas últimas no tienen presente que en casos referidos a la salud el consumidor no siempre conoce cuales son sus necesidades, en ocasiones no puede expresarlas (niño, paciente anestesiado, etc.), o incluso puede ser contrario a ellas.
-

Debido a la importancia que ha cobrado la necesidad de dotar de calidad a lo producido en los sectores industrial y de servicios, se han desarrollado una serie de herramientas administrativas para tratar y manejar ordenadamente todo lo relacionado con este tema.

De esta forma, la Gestión de la Calidad, entendida como el conjunto de actividades dirigidas a establecer objetivos y responsabilidades, y asegurar que éstos se cumplan mediante un plan estratégico, se ha convertido en una parte muy importante de la gestión general de

cualquier organización. El proceso de Gestión de Calidad ayuda a poner en práctica medidas de Garantía de Calidad, entre las cuales las Buenas Prácticas de Fabricación y Control se cuentan como un elemento fundamental. Las BPFyC prescriben la necesidad de efectuar Control de Calidad, convirtiendo a esta actividad en una herramienta útil e idónea para la toma de decisiones en relación a la calidad de los productos (Figura I.1.1).

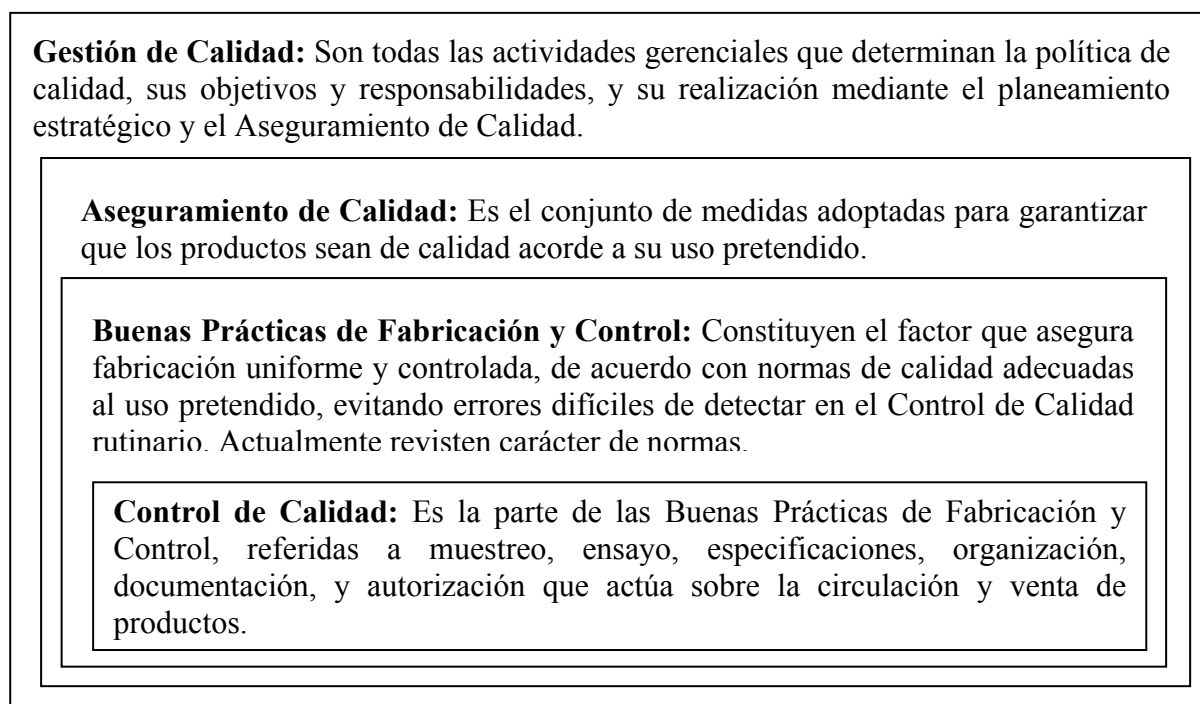


Figura I.1.1. Diagrama de la relación entre Gestión de Calidad, Aseguramiento de Calidad, BPFyC y Control de Calidad.

La calidad es un parámetro importante para todos los sectores industriales, pero adquiere aún mayor relevancia en la industria farmacéutica. La exigencia de calidad en los productos de interés farmacéutico es indiscutible, por la propia naturaleza de los productos farmacéuticos, potencialmente capaces de producir efectos perjudiciales para la salud, en contraposición con su finalidad intrínseca de prevención de enfermedad y restauración de la salud.

La necesidad de adherir a los requisitos de las Buenas Prácticas de Fabricación y Control es actualmente incuestionable y lo que en un principio fueron guías de trabajo se han

convertido en normas aplicables con fuerza de ley.

Los fabricantes europeos de medicamentos deben cumplir con las Normas para la Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Medicamentos Veterinarios de la Unión Europea⁴ y existen normas equivalentes en EEUU (<http://www.fda.gov/CDRH/DEVADVICE/32.html>), Japón⁵ y el resto de los países que alojan a los mayores productores mundiales de medicamentos. La OMS también se ha pronunciado al respecto, emitiendo su propio texto ordenado de BPFyC.⁶ En Argentina, las normas actualmente vigentes están contenidas en la Farmacopea Argentina,⁷ radicando el poder de policía para garantizar su cumplimiento, en la ANMAT.

Estas normativas establecen de forma explícita la obligación de la industria farmacéutica en sus diferentes expresiones, de llevar a cabo el Control de Calidad. Para este cometido es necesario un Departamento de Control de Calidad, autónomo del resto de departamentos de la empresa, que lleve a cabo las funciones de calidad (Tabla I.1.2). A su vez, el Control de Calidad es un elemento muy importante en la Gestión de Calidad de la empresa, ya que es la herramienta que permite asegurar que los productos fabricados cumplen con una serie de requisitos, que los definen como “de calidad”.

Tabla I.1.2. Actividades relevantes propias de las funciones de la calidad.

• Ensayar (material de partida, en proceso, final).	• Efectuar el mapeo de tendencias y mapeo de control.
• Documentar y aprobar documentación.	• Validar equipos y procesos.
• Controlar y aprobar el rotulado.	• Efectuar la liberación en proceso.
• Aprobar, auditar y vigilar a los proveedores.	• Desarrollar y validar el sistema de ensayos.
• Recibir y liberar materiales de partida.	• Efectuar el muestreo.
• Establecer y aprobar en general.	• Disponer del material que no conforma.
• Efectuar el control estadístico de procesos.	• Efectuar entrenamiento del personal.

En este contexto, el *Control de Calidad* puede ser definido como la combinación de sistemas, procedimientos, instrucciones y actividades realizadas para controlar y mantener un trabajo de calidad. En lo referido a los productos de interés farmacéutico, esto se refiere a la integridad de las materias primas, productos intermediarios y productos elaborados. La correcta práctica de esta actividad entraña una vigilancia sistemática de la calidad.

El objetivo fundamental del control de calidad de medicamentos es asegurar que cuando una forma farmacéutica sea dispensada al paciente, ésta cumpla con todas las especificaciones de identidad, pureza, dosis, potencia, eficacia terapéutica e inocuidad, como así también en lo referido a sus propiedades organolépticas y características farmacotécnicas.

I.2. LOS MEDICAMENTOS

Los medicamentos son las sustancias que se utilizan para mantener o alcanzar el estado de salud, por sus propiedades biológicas y no por sus efectos como nutrientes, lo que los diferencia de los alimentos.

La Farmacopea Argentina 7º Edición, en vigencia, define medicamento como “*toda preparación o producto farmacéutico empleado para la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de una enfermedad o estado patológico, o para modificar sistemas fisiológicos en beneficio de la persona a quien se le administre*”.⁸

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), medicamento es “*toda sustancia o mezcla de sustancias fabricada, vendida, puesta a la venta o recomendada para 1) el tratamiento, el alivio, la prevención o el diagnóstico de una enfermedad, de un estado físico anormal o de los síntomas de una u otro en el hombre o en los animales, o 2) el restablecimiento, la corrección o la modificación de funciones orgánicas en el hombre o en los animales*”.⁹

Existen actualmente dos categorías legales de fármacos, que incluyen los que requieren

prescripción médica y los que no la requieren. Los primeros deben utilizarse sólo bajo control médico y por lo tanto se venden contra la presentación de una receta emitida y firmada por un profesional de la medicina, sea médico, odontólogo o veterinario, según corresponda. En cambio, los segundos se expenden sin receta ya que su utilización se considera segura sin el estricto control médico.

Independientemente de las restricciones para su expendio, todos los fármacos están sujetos al mismo tipo de filosofía en cuanto a las normas que rigen su fabricación y el control de su calidad. El aseguramiento de la calidad, la adopción de BPFyC y el control de calidad en todas las etapas del proceso de elaboración de los medicamentos son parte integral de esta filosofía.

Los fármacos pueden administrarse por distintas vías. Se pueden ingerir (vía oral) o inyectar ya sea en una vena (vía intravenosa), en un músculo (vía intramuscular) o debajo de la piel (vía subcutánea). Se pueden colocar debajo de la lengua (vía sublingual), introducir en el recto (vía rectal), instilar en el ojo (vía ocular), pulverizar en las fosas nasales (vía nasal) o en la boca (vía inhalación), o bien aplicar sobre la piel con efecto local (vía tópica) o sistémico (vía transdérmica), entre otras.¹⁰

Todas estas vías de administración tienen objetivos terapéuticos específicos, presentando a su vez ventajas y desventajas. Por las ventajas inherentes a la vía oral, actualmente la mayoría de los medicamentos se administra de ese modo, principalmente mediante formas farmacéuticas sólidas como comprimidos o cápsulas.¹¹

I.2.1. Formas Farmacéuticas Sólidas de Administración Oral

En general, las formas farmacéuticas sólidas (FFS) de administración oral constituyen el medio más común para vehicular un principio activo dentro del organismo humano, debido a su practicidad tanto en la toma como en la producción industrial.

Las cápsulas y los comprimidos constituyen las formas farmacéuticas de uso más habitual. Además de los comprimidos típicos, existen otros tales como sublinguales, efervescentes y masticables. También se cuentan las pastillas, que son formas farmacéuticas sólidas y elásticas, destinadas a disolverse lentamente en la boca, que se utilizan generalmente para conseguir efectos locales.

Por otra parte existen formas farmacéuticas constituidas por una mezcla de sólidos finamente divididos, denominados polvos, en cambio, cuando los constituyentes han sido sometidos a un proceso que los transformó en granos más o menos gruesos según convenga, se denominan granulados. Otras formas farmacéuticas sólidas son los sobres, las tabletas y las formas recubiertas; estas últimas son productos obtenidos con diversos fines, que incluyen evitar los efectos indeseables a nivel gástrico e impedir la degradación del fármaco.¹²

Durante el control de calidad de las FFS y los medicamentos en general debe tenerse en cuenta una serie de parámetros de comprobación o verificación de la calidad. Los ensayos más comúnmente prescritos incluyen la inspección visual, que procura la verificación del aspecto; por otra parte, se indican pruebas químicas tendientes a la identificación del principio activo, la limitación de impurezas y el control de dosis. Otro conjunto de ensayos se relaciona más específicamente con la forma farmacéutica e incluye el estudio de propiedades fisicoquímicas, la disolución y la uniformidad de unidades de dosificación. En casos puntuales, aunque con creciente frecuencia, se requiere hacer uso de pruebas biológicas o bioquímicas.¹³

1.2.1.1. Comprimidos

Los comprimidos son *“formas farmacéuticas sólidas de dosificación, que contienen ingredientes farmacéuticamente activos junto con diluyentes apropiados o sin ellos y que se preparan mediante compresión o moldeado”*.¹⁴

A pesar de contar con más de un siglo de historia, los comprimidos continúan siendo una forma farmacéutica extremadamente popular. Esto se debe tanto a las ventajas que ofrecen al fabricante, que incluyen sencillez y economía de la preparación, estabilidad y conveniencia para envasar, transportar y expedir; como así también a los beneficios que proporcionan al paciente, entre los que se cuentan exactitud y reproducibilidad de la dosis, su forma farmacéutica compacta y su facilidad para ser transportados y administrados convenientemente. Los parámetros y caracteres fundamentales que deben ser controlados durante y después de la producción de comprimidos se detallan en la Tabla I.2.1.

Tabla I.2.1. Clasificación de los caracteres y parámetros de calidad de los comprimidos.

Caracteres	Parámetro de calidad
➤ <i>Organolépticos</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Apariencia visual ▪ Olor ▪ Textura ▪ Sabor
➤ <i>Geométricos</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Forma y marcas ▪ Dimensiones (diámetro, corona, borde)
➤ <i>Mecánicos</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dureza ▪ Resistencia mecánica (friabilidad)
➤ <i>Químicos</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ensayo de los fármacos ▪ Ensayo de los productos de degradación ▪ Ensayo de contaminantes
➤ <i>Posológicos</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Variación de peso ▪ Uniformidad de contenido
➤ <i>De estabilidad</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Estabilidad del fármaco ▪ Estabilidad del color ▪ Efectos de la humedad ▪ Efectos de la luz ▪ Efectos del calor ▪ Efectos de oxidantes ▪ Efectos de ácidos y bases ▪ Condiciones de reposición
➤ <i>De biodisponibilidad</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tiempo de desintegración ▪ Velocidad de disolución ▪ Biodisponibilidad (<i>in vivo</i>) ▪ Perfil de disolución ▪ Bioequivalencia ▪ Ensayos alternativos

I.2.1.2. Cápsulas

Las cápsulas constituyen la segunda FFS de administración oral más frecuentemente utilizada, después de los comprimidos. Una cápsula consiste de “*una envoltura de sustancias fisiológicamente indiferentes, para dosis únicas de un principio activo en estado sólido, líquido o semilíquido, así como para la mezcla de estas sustancias con sus coadyuvantes*”.¹¹ A pesar de contar con algunas desventajas en su producción en comparación con los comprimidos, principalmente de costo, las cápsulas son muy versátiles y efectivas al momento de la administración.

I.2.2. Liberación de los Principios Activos a Partir de FFS

Los caracteres de biodisponibilidad, relacionados con la liberación de los principios activos a partir de FFS, se encuentran entre los parámetros de calidad a controlar (Tabla I.2) que resultan más complicados de medir o evaluar en ensayos de laboratorio, ya que en la práctica es muy difícil de reproducir *in vitro* lo que ocurre *in vivo*.

La biodisponibilidad está relacionada con el grado de absorción de un fármaco y su tenor en sangre. La biodisponibilidad de un principio activo dado depende de varios factores que incluyen el modo en que se diseña y produce el FFS que lo contiene, las propiedades físicas y químicas de este último y la fisiología de la persona que recibe el medicamento. En estudios específicos de biodisponibilidad, para productos de muy elevado riesgo sanitario, se emplean ensayos *in vitro* sólo después de demostrar su correlación con los procesos *in vivo*.¹⁵

Como se mencionó más arriba, la forma de hacer más efectiva la dosificación de los fármacos es mediante la administración de productos farmacéuticos formulados. Así, los comprimidos por ejemplo, consisten en una mezcla de uno o más principios activos con una serie de aditivos (excipientes) que cumplen diversas funciones, actuando como diluyentes, estabilizantes, desintegrantes, colorantes, lubricantes, etc.

El tipo y la cantidad de aditivos, así como el proceso de elaboración, condicionan varios de los parámetros de calidad de los comprimidos, entre los que se cuenta su dureza, friabilidad, desintegración y velocidad de disolución del principio activo.

1.2.2.1. Equivalencia

La biodisponibilidad debe ser una propiedad constante entre lotes de un mismo producto farmacéutico y de productos bioequivalentes. Dos productos farmacéuticos son *bioequivalentes* cuando, conteniendo el mismo principio activo, en la misma forma química y dosis, demuestran proporcionar perfiles y tenores estadísticamente equivalentes del fármaco en sangre. La *bioequivalencia* asegura así la *equivalencia terapéutica* y un hecho no menos importante, la intercambiabilidad, ya que *los productos bioequivalentes son intercambiables*.¹⁶

En consecuencia, puede producirse falta de equivalencia cuando productos que son *químicamente equivalentes* por contener el mismo principio activo, presentan componentes inactivos diferentes que afectan la proporción y el grado de su absorción en el organismo.¹⁷

Del mismo modo, si el principio activo presenta varias formas de cristalización, aspecto conocido como polimorfismo cristalino, la sola presencia de una forma cristalina diferente a la originalmente aceptada podría llegar a ocasionar serios problemas.¹⁸ En este caso, a pesar de ser administrados a una misma dosis, los efectos de dos fármacos elaborados con los mismos excipientes, aún siendo químicamente equivalentes, podrían variar de un producto farmacéutico a otro.

I.3. CONTROL DE CALIDAD DE MEDICAMENTOS

I.3.1. Criterios de Calidad de los Medicamentos

El veredicto del juicio sobre la calidad de un medicamento surge del grado de

cumplimiento de las especificaciones impuestas al mismo en la monografía pertinente, ya sea ésta oficial o no. Cada especificación viene acompañada de un procedimiento de ensayo que indica las condiciones bajo las cuales debe observarse la respuesta buscada, a los fines de una posterior evaluación del cumplimiento de la especificación.

Las especificaciones y los ensayos correspondientes que más utilidad presentan para la evaluación de la calidad de los principios activos y los medicamentos son los de *identidad, pureza, riqueza y acción*. Según la naturaleza del producto, éstos pueden fundarse en reacciones o propiedades químicas, físicas o biológicas de los analitos, o una combinación apropiada de las mismas.

1.3.1.1. Especificaciones y ensayos de identidad

Las especificaciones y ensayos de identidad tanto para los principios activos como para los productos farmacéuticos formulados, tienen por objeto demostrar fundamentalmente que la muestra examinada contiene los ingredientes activos que debe contener.¹⁹

Los ensayos de identidad deben proporcionar resultados inequívocos. Sin embargo, la especificidad, signo irrefutable de que el ensayo de identidad es fidedigno, no está siempre asegurada ni es fácil de alcanzar, por lo que suele emplearse más de un ensayo para lograr este objetivo.²⁰ Por ello, los ensayos típicos de identidad hacen uso combinado de propiedades físicas y químicas de los analitos, como así también de caracteres espectrales y, en menor medida, de su movilidad cromatográfica bajo condiciones específicas.

1.3.1.2. Especificaciones y ensayos de pureza

Las especificaciones de pureza instauran límites máximos a las concentraciones aceptables de impurezas en las materias primas²¹ y en los medicamentos.²² Habitualmente, las normas establecen especificaciones para las impurezas que resultan de la degradación natural

del producto, durante y después de la formulación, para las que pueden ser nocivas y para aquéllas cuya presencia puede indicar la falta de aplicación de las prácticas de fabricación o almacenamiento recomendadas.

Los límites permitidos varían según el tipo de impureza. Cuando la naturaleza de las impurezas se conoce, el máximo tenor permitido de las mismas suele expresarse como un límite numérico individual de concentración. Por otro lado, cuando la naturaleza de éstas se desconoce o se trata de un número importante de ellas, la tolerancia suele indicarse como una respuesta colectiva máxima aceptada en condiciones especificadas de examen.²³

Las características de sensibilidad, exactitud y precisión de los ensayos de pureza deben ser adecuadas en relación con los niveles de tolerancia permitidos en la norma correspondiente. Estos ensayos emplean desde las técnicas analíticas más sencillas (por ejemplo, pérdida por secado²⁴ o reacciones cromáticas y CCD)²⁵ a las determinaciones más complejas, que incluyen Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE)²⁶ cuando se trata de metodologías oficiales, como así también métodos fluorescentes,²⁷ electroforéticos²⁸ o cromatográficos acoplados, de uso cada vez más frecuente, en la analítica farmacéutica no oficial.²⁹ Estos últimos son especialmente útiles para estimar bajos niveles de impurezas, particularmente cuando éstas son altamente tóxicas.³⁰

1.3.1.3. Especificaciones y ensayos de riqueza

Las especificaciones de riqueza indican el tenor aceptable del principio activo presente. Las mismas se expresan como los valores límites referidos a la concentración o tenor del ingrediente activo en la materia prima o el medicamento. El cumplimiento con estos valores se determina mediante lo que se conoce como *ensayo* (en inglés, *assay*) o *valoración*.

Los procedimientos analíticos cuantitativos que se utilizan para la determinación de la riqueza comprenden métodos tan diversos como volumetría, espectroscopia³¹ y

cromatografía,³² todas ellas de amplio uso en la analítica oficial, como así también metodologías basadas en reacciones electroquímicas,³³ térmicas,³⁴ espectrométricas,³⁵ inmunoquímicas³⁶ y biológicas,³⁷ cada vez más difundidas en el análisis farmacéutico no oficial.

La exactitud, precisión y especificidad de los ensayos se cuentan entre las consideraciones principales que han de tenerse en cuenta al desarrollar nuevos métodos de determinación cuantitativa de un ingrediente activo, ya que estos ensayos deben permitir la determinación específica de la sustancia activa intacta.

Debido a que pueden estar presentes otras sustancias capaces de interferir con el análisis, para garantizar la especificidad de la determinación suele ser preciso aplicar previamente técnicas de separación, que incluyen la extracción, la precipitación y la cromatografía.³⁸ Estas técnicas separativas, que suman tiempo y costos al análisis, requieren un apropiado control, ya que de lo contrario pueden producir errores analíticos de importancia.

Para establecer los límites de concentración o actividad aceptables en la especificación, deben tenerse en cuenta todos los errores que podrían provocar las sustancias que interfieren en la determinación, así como la inexactitud e imprecisión del propio ensayo, de modo que cuando el tenor de la sustancia determinada exceda (en más o en menos) los límites autorizados, sea posible considerar inequívocamente que existe una contravención de la especificación, independientemente de los errores inherentes al método empleado.

1.3.1.4. Especificaciones y ensayos de acción de las distintas formas farmacéuticas

Las especificaciones y los ensayos de acción tienen por objeto dar garantía razonable de que la forma farmacéutica actuará del modo previsto. Un ejemplo de ensayo de acción, cuya implementación debe reproducir directamente las condiciones de administración previstas, es

la medición del “contenido unitario de pulverización” de los productos en forma de aerosol. En este ensayo se compara específicamente la cantidad promedio de ingrediente activo liberado al accionar una vez el dosificador de un aerosol, con la dosis prevista declarada en el rótulo.

El ensayo de disolución cumple una función similar, al evaluar la cantidad del principio activo entregado³⁹ a un medio desde una FFS;⁴⁰ además, el mismo permite supervisar el proceso de fabricación de dicha FFS de un modo integral,⁴¹ encontrándose por este motivo en la mayoría de las monografías oficiales de comprimidos y constituyendo un requisito legal de importancia para los comprimidos no oficiales.

1.3.1.5. El ensayo de disolución y la “similitud” entre lotes

Ante ciertos cambios menores en la manufactura de FFS, la prueba de disolución es el método más apropiado para asegurar que no haya cambios de calidad y rendimiento en el producto. La misma suele llevarse a cabo verificando la cantidad disuelta de los principios activos a un punto único temporal, tanto en el producto antes del cambio como en el material producido tras el cambio.

Sin embargo, para cambios más importantes se recomienda una comparación de perfiles de disolución, realizados bajo condiciones idénticas para el producto antes y después del cambio. Esta estrategia también puede ser empleada para comparar lotes de productos químicamente equivalentes de diferentes marcas, como así el efecto de modificaciones en las variables de la formulación.

Existen distintos enfoques para decidir acerca de la similitud de perfiles de disolución;⁴² los recomendados por la FDA como agencia de control y que se detallan a continuación, se pueden agrupar en métodos modelo-independientes y modelo-dependientes (<http://www.fda.gov/cder/audiencias/iact/1713bp1.html>). También existe un enfoque alternativo, que a

pesar de no ser mencionado en ningún documento oficial de la FDA es ampliamente utilizado en la literatura. Este grupo está compuesto por métodos de comparación basados en el análisis de la variancia.⁴³

Debido a los errores que puede introducir la variabilidad instrumental, en todos los casos, además de la consabida calificación del instrumento, para llevar a cabo el ensayo de disolución es necesario estandarizar parámetros operativos,⁴⁴ especialmente los que influyen decisivamente en los resultados del ensayo de disolución.⁴⁵

1.3.1.5.A. Enfoque modelo-independiente utilizando los indicadores de similitud y diferencia

Un enfoque sencillo modelo-independiente es el que utiliza un indicador de diferencia (f_1) y un indicador de similitud (f_2) para comparar los perfiles de disolución.⁴⁶ El indicador de diferencia (f_1) calcula la diferencia porcentual (%) entre los perfiles de disolución del producto de referencia y la muestra bajo ensayo en cada punto temporal, haciéndola acumulativa y relativa a la curva de referencia. El mismo es una medida del error relativo entre las dos curvas. La fórmula de cálculo de f_1 se desarrolla en la Ecuación I.1.

$$f_1 = 100 \times \left(\frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \right) \quad [\text{I.1}]$$

donde n es el número de puntos temporales, R_t es el valor de disolución del conjunto de referencia al tiempo t , y T_t es el valor de disolución de la serie de prueba al mismo tiempo t .

Por su parte, el indicador de similitud (f_2) consiste en una transformación matemática compleja, que involucra el logaritmo del inverso de la raíz cuadrada de la sumatoria de los errores cuadráticos, que representan la diferencia entre las curvas de disolución de referencia y de la muestra incógnita.

Este parámetro es una aproximación a la evaluación del grado de similitud entre dos curvas en cuanto a su porcentaje de disolución. La fórmula de cálculo de f_2 se detalla en la Ecuación I.2, donde t , R_t y T_t tienen el mismo significado que en la Ecuación I.1.

$$f_2 = 50 \times \log \left[\left(1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right)^{-0,5} \times 100 \right] \quad [I.2]$$

Un procedimiento específico típico para determinar los indicadores de diferencia y similitud, incluye las etapas que se detallan en la Tabla I.3.1.

Tabla I.3.1. Procedimiento para la determinación de f_1 y f_2 . Conclusiones y toma de decisión.

-
1. Determinar el perfil de disolución del producto en las unidades de prueba y referencia, empleando 12 unidades de dosis en cada caso.
 2. Usar los valores de disolución promedios de ambas series de curvas en cada intervalo temporal (perfiles de disolución); calcular el indicador de diferencia (f_1) y el indicador de similitud (f_2) usando las Ecuaciones I.1 y I.2, respectivamente.
 3. Según este enfoque, si se cumple que $0 \leq f_1 \leq 15$ y $50 \leq f_2 \leq 100$, la similitud o equivalencia de las dos curvas se encuentra confirmada y, por lo tanto, puede afirmarse que existe similitud entre los productos de prueba y referencia.
-

Este método modelo-independiente es recomendado por la FDA como el más conveniente para la comparación de los perfiles de disolución, aunque no está exento de inconvenientes, ya que impone ciertas restricciones a los datos aceptables y requiere tener en cuenta una serie de recomendaciones y condiciones, de modo de asegurar una correcta comparación, las que se detallan en la Tabla I.3.2.

I.3.1.5.B. Enfoque modelo-independiente utilizando una región de certeza multivariada

En casos donde la variación dentro de la serie presenta un CV mayor al 15%, para la

comparación de los perfiles de disolución se recomienda emplear un procedimiento multivariado modelo-independiente. Este tipo de análisis se basa en la determinación de una distancia estadística multivariada (DEM), que representa las diferencias en términos de disolución entre las tandas de prueba en relación a las tandas tomadas como referencia.

Tabla I.3.2. Requisitos para la correcta implementación del cálculo de f_1 y f_2 .

-
- La determinación debe hacerse sobre 12 unidades en los conjuntos de prueba e incógnita.
 - Requiere cuatro o más puntos temporales de disolución disponibles.
 - Puede usarse no más de una determinación con tenores de disolución superiores al 85% para ambos productos.
 - Para habilitar el uso de los perfiles, el coeficiente de variación en los puntos temporales iniciales (anteriores a los 15 minutos) no deberá ser más del 20%, y en otros puntos temporales no deberá superar el 10%.
 - Al comparar lotes previos y posteriores a un cambio, los valores de disolución promedios (perfil de disolución) del conjunto de referencia pueden derivarse ya sea del último lote anterior al cambio o de los dos o más últimos lotes fabricados consecutivamente antes del cambio.
-

1.3.1.5.C. Enfoques modelo-dependientes

Se han descrito en la literatura varios modelos matemáticos capaces de describir los fenómenos de disolución, los más utilizados se detallan en la Tabla I.3.3. Entre ellos merece una mención especial el modelo de Weibull por su amplio uso en el campo farmacéutico.

La denominada función Weibull, ha sido utilizada en varios trabajos para describir la disolución y la cinética de liberación de principios activos debido a su excelente capacidad para describir matemáticamente las curvas. Sin embargo, el empleo de este modelo ha recibido serias críticas porque emplea el ajuste de parámetros “no físicos”, como por ejemplo el parámetro “ β ”, que carece de sentido real. ⁴⁷

Tabla I.3.3. Selección de procedimientos para comparar perfiles de disolución. Modelos operativos para casos modelo-dependientes.

Tipo de Modelo	Ecuación Fundamental
Orden Cero	Principio Activo Disuelto (%) = $k \times t$
Orden Uno	Principio Activo Disuelto (%) = $A \times (1 - e^{-k \times t})$
Hixson-Crowell ^a	Principio Activo Disuelto (%) = $100 \times [1 - (1 - k \times t / 4,6416)^3]$
Higuchi	Principio Activo Disuelto (%) = $k \times t^{0,5}$
Probit	Principio Activo Disuelto (%) = $A \times \Phi \times [\alpha + \beta \log(t)]$
Cuadrático	Principio Activo Disuelto (%) = $A \times (k_1 \times t^2 + k_2 \times t)$
Weibull	Principio Activo Disuelto (%) = $A \times [1 - e^{-(k \times t)^\beta}]$
Gompertz	Principio Activo Disuelto (%) = $A \times e^{-e^{-[k \times (t - \gamma)]}}$
Logístico	Principio Activo Disuelto (%) = $A / [1 + e^{-k \times (t - \gamma)}]$

^a El valor esperado de A es 100%

Los procedimientos sugeridos para permitir la aplicación de estos modelos a la comparación de perfiles de disolución incluyen las etapas que se detallan en la Tabla I.3.4.

1.3.1.5.D. Enfoque basado en el análisis de la variancia (ANOVA)

Los métodos basados en Anova pueden ser diferenciados como ANOVA Multivariado (denominado MANOVA), ANOVA-univariado en la modalidad “a un factor” (ANOVA-1), o “a dos factores” (ANOVA-2), y en la modalidad de evaluación de “nivel y forma”.⁴⁸

En el análisis de la variancia a un factor se realizan comparaciones estadísticas de los datos promedios de la disolución en cada punto temporal de la disolución. El análisis ANOVA-1 es equivalente a una prueba *t* de Student en el que los datos de perfil de disolución para dos formulaciones están siendo comparados. En un modelo ANOVA el tiempo es considerado sólo un efecto de clase. Este modelo es de gran utilidad cuando se dispone de un juego pobre de datos de sólo dos o tres tiempos de observación, que provienen del control de calidad rutinario de una forma de dosificación de liberación inmediata.⁴⁹

Para ensayar la hipótesis de que los perfiles de disolución para cada formulación son paralelos y la disolución es en el mismo nivel, puede ser utilizado un modelo de efectos mixto.⁵⁰ El modelo de efectos mixto contiene una mezcla de efectos fijos y arbitrarios.

Tabla I.3.4. Procedimientos para aplicar modelos matemáticos en la comparación de perfiles de disolución.

1. Seleccionar el modelo matemático más apropiado para ajustar los perfiles de disolución de los lotes de referencia, anteriores al cambio y aprobados. Usualmente se recomienda un modelo con no más de tres parámetros, como los modelos lineal, cuadrático, logístico, probit⁵¹ y de Weibull.
 2. Ajustar los datos del perfil al modelo más apropiado, empleando para el perfil los datos generados por las diferentes unidades, habitualmente en número de 12.
 3. Establecer una región de similitud basada en la variación de los parámetros del modelo ajustado con las unidades de referencia.
 4. Ajustar el mismo tipo de modelo con los datos de prueba y calcular la DEM en los parámetros del modelo entre las tandas de prueba y referencia.
 5. Calcular la región de confianza del 90% de la diferencia entre las dos tandas.
 6. Comparar los límites de la región de confianza con la región de similitud.
 7. Toma de decisión: Si la región se encuentra dentro de los límites de la región de similitud, se considera que la tanda de prueba tiene un perfil de disolución similar a la tanda de referencia.
-

En el contexto de una comparación de datos de perfil de disolución, el efecto fijo es la formulación, la cual tendrá solamente dos niveles, prueba y referencia. El efecto arbitrario en el modelo es la unidad de dosificación, que para cada formulación tiene tantos niveles diferentes como unidades de dosificación haya en el lote; habitualmente, para el ensayo deben tomarse 12 unidades. Para una formulación dada, la prueba de disolución se hace sobre un número de unidades de dosificación que son seleccionadas al azar; de ese modo, el efecto de

la unidad de dosificación es aleatorio, ya que las inferencias serán hechas sobre la formulación, a partir de ensayos efectuados sobre las unidades de dosificación seleccionadas al azar.

La principal crítica a esta clase de métodos radica en que este tipo de ensayo de hipótesis está fuertemente dirigido hacia la identidad estadística de las curvas, dejando de lado el concepto fundamental de la identidad de acción farmacéutica.⁵⁰

1.3.1.6. Recursos analíticos para verificar el cumplimiento de las especificaciones

Para cumplimentar los requerimientos legales y las especificaciones enunciadas más arriba, es de suma importancia la elección de técnicas analíticas apropiadas. Como respuesta a estas necesidades analíticas, se han desarrollado y evaluado diversos métodos analíticos útiles tanto para la identificación como para la determinación de principios activos, como tales y en preparaciones farmacéuticas, muchos de los cuales se encuentran codificados en las farmacopeas (métodos oficiales). Asimismo, existen diversos métodos para la determinación de las mismas y sus metabolitos en fluidos biológicos (plasma, orina y otras matrices complejas).

En general, los métodos capaces de cuantificar analitos en muestras complejas requieren pasos previos de preparación de la muestra, entre los que se incluyen separaciones físicas o la formación de derivados, que a menudo los vuelven engorrosos y poco prácticos para el análisis de rutina. Entre las soluciones analíticas cuantitativas más comúnmente empleadas en los laboratorios de control de calidad de medicamentos se encuentran las metodologías basadas en métodos cromatográficos (CLAE y CG)⁵² como así también espectroscópicos (colorimétricos,⁵³ espectrofotométricos⁵⁴ y fluorimétricos)⁵⁵ en los que se han tomado todas las precauciones (preparación de la muestra, condiciones de medida, etc.) para evitar que otros componentes de la muestra interfieran con la determinación. En muchos casos, para la

resolución del problema analítico suele no disponerse de más de una alternativa válida para el control de calidad, siendo esto un aliciente para el desarrollo de nuevas metodologías.

La espectroscopia de excitación electrónica ha sido ampliamente usada en el análisis farmacéutico oficial durante los últimos 50 años.⁵⁶ Su rapidez, sensibilidad, bajo costo y la aptitud de permitir la realización de un gran número de mediciones en cortos tiempos hace de la misma una técnica adecuada para el control analítico de formulaciones farmacéuticas, donde la mayoría de sus componentes activos absorben en la región UV-visible.

A su vez, la espectroscopia en el infrarrojo es ampliamente usada tanto en laboratorios de investigación como en la industria a modo de alternativa simple y confiable para realizar actividades de control de calidad⁵⁷ y mediciones dinámicas.^{39,58} En la actualidad, los instrumentos son pequeños y pueden transportarse fácilmente, lo cual ha difundido su uso. Además, por sus características, esta espectroscopia presenta la ventaja de poder aplicarse tanto a muestras gaseosas, como líquidas y sólidas ya sea en solución o en su estado puro, lo cual es especialmente útil, ya que la totalidad de los compuestos orgánicos presenta absorción en esta región del espectro electromagnético.

Es importante destacar que en el caso de mezclas complejas de especies absorbentes con un importante solapamiento espectral, la aplicación de la espectroscopia tanto en el UV como el IR, en el modo tradicional se ve limitada, ya que el solapamiento dificulta o impide la determinación simultánea de principios activos en forma individual, o al menos resta especificidad a la cuantificación. Además, los espectros IR obtenidos a partir de diferentes preparaciones de la muestra pueden ser ligeramente diferentes entre sí, y la humedad ambiente así como el dióxido de carbono producen absorción significativa en zonas espectrales de interés, por lo que ciertas aplicaciones cuantitativas pueden resultar dificultosas sin un tratamiento matemático-computacional adecuado.

I.4. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Según la Farmacopea Argentina 7° Edición⁵⁹ y otros textos de alcance similar relacionados con la calidad de los medicamentos, la validación de un método analítico *es el proceso por el cual se establece, por medio de estudios de laboratorio debidamente documentados, que dicho método es apropiado para el uso propuesto*. En la Tabla I.4.1. se muestran los objetivos más importantes de la validación analítica.

Tabla I.4.1. Objetivos más trascendentes de la validación analítica.

-
- Garantizar la coherencia entre los resultados obtenidos y las necesidades que han requerido su obtención.
 - Asegurar la calidad y constancia de la calidad de la información obtenida.
 - Caracterizar métodos y herramientas analíticas.
 - Facilitar las auditorías de calidad.
 - Proveer fundamentos adecuados a la transferencia de métodos y otras herramientas analíticas y a la armonización de los resultados entre los laboratorios, con el objetivo de conseguir el reconocimiento mutuo entre laboratorios.
-

Las BPFyC requieren que los métodos analíticos empleados para evaluar el cumplimiento de las especificaciones establecidas sean apropiados; dicha condición se adquiere mediante el proceso de validación. El alcance de los métodos oficiales ha sido demostrado y su uso requiere actividades menores de validación, pero cuando se trata de métodos no oficiales, éstos deben ser cuidadosamente validados antes de su aplicación.

Mediante la validación analítica se demuestra que los parámetros de calidad del método satisfacen los requisitos de la aplicación analítica concreta propuesta, produciéndose además un documento que lo prueba o demuestra. Para ello, se requiere de experimentación y comparación con valores de referencia perfectamente bien conocidos.

Uno de los requisitos básicos para llegar al cumplimiento de estos objetivos es que el laboratorio donde se realicen los ensayos trabaje aplicando los conceptos de BPFyC, que garanticen la calidad de los resultados obtenidos. Estas normas enfatizan la importancia de una buena organización, empleo de personal calificado, instalaciones apropiadas, equipos y aparatos adecuados, en buen estado y calificados, métodos escritos, actualizados y disponibles, un registro adecuado de los resultados y una posterior supervisión y verificación de los mismos.

Tabla I.4.2. Enfoques empleados para realizar la validación según la información disponible.

-
- **Prospectivo:** Para metodologías nuevas; deben recolectarse todos los datos necesarios.
 - **Retrospectivo:** Para metodologías en uso, que no han sido oportunamente validadas y de las cuales se posee suficiente información para permitir su validación.
 - **Concurrente:** Para metodologías en uso, de las que se cuenta con resultados pero no se dispone de toda la información requerida; ello implica trabajar conjuntamente con datos históricos y con otros a obtener en el momento de efectuar la validación.
 - **Revalidación:** Para metodologías validadas en las cuales se han introducido cambios. El grado de revalidación dependerá de la naturaleza e importancia de los cambios.
-

Numerosos textos oficiales pueden servir de guía para la validación de métodos analíticos, incluyendo las Farmacopeas, como así también las Guías de la Conferencia Internacional de Armonización (<http://www.ich.org>). Con pequeñas diferencias de nomenclatura, todos ellos se basan en el estudio de los mismos parámetros de calidad. Los enfoques para llevar a cabo la validación según la información disponible se detallan en la Tabla I.4.2. En los trabajos realizados en esta Tesis se utilizaron las guías de ICH, la USP30⁶⁰ y la FA 7^o Edición,⁵⁹ como orientación para la validación de los métodos analíticos desarrollados.

I.4.1. Atributos Analíticos

Para la validación de un método analítico es necesaria la determinación y evaluación de una serie de parámetros que definen su calidad. Los diferentes parámetros a evaluar dependen de la naturaleza y la finalidad del método analítico. En la Tabla I.4.3 se muestran de forma esquemática, los parámetros de calidad analítica que requieren de validación y cuáles de ellos deben ser evaluados, según lo estipulado por la FA 7ª Edición,⁵⁹ para los diferentes tipos de ensayos analíticos de utilidad en el control de calidad farmacéutico.

Tabla I.4.3. Parámetros de calidad a evaluar en la validación de distintos ensayos analíticos, según su finalidad.

Característica	Valoración	Determinación de Impurezas		Desempeño	Identificación
		Cuantitativo	Ensayo límite		
Exactitud	+	+	*	*	-
Precisión					
<i>Repetibilidad</i>	+	+	-	+	-
<i>Precisión Intermedia</i>	+	+	-	+	-
Especificidad	+	+	+	*	*
Límite de detección	-	-	+	*	-
Límite de cuantificación	-	+	-	*	-
Linealidad	+	+	-	*	-
Intervalo	+	+	*	*	-

(+) Requerido siempre, (-) no requerido y (*) requerido según el caso.

I.4.1.1. Exactitud

La exactitud de un método analítico refleja la proximidad entre el resultado obtenido por su aplicación y el valor real de la variable estimada. Es conveniente establecer la exactitud en todo el intervalo de trabajo especificado para el método analítico. ICH recomienda realizar un mínimo de nueve determinaciones, cubriendo al menos tres niveles de concentración (tres niveles con tres replicados).

También puede estimarse la exactitud determinando el porcentaje de recuperación del analito, tras agregar una cantidad conocida del mismo a una muestra dada (fortificación, método de agregado de estándar), o como la diferencia entre el promedio de varias recuperaciones junto con su correspondiente intervalo de confianza y el valor aceptado como verdadero.

La exactitud en un método quimiométrico se suele evaluar de forma similar, determinándose la magnitud que mida el método, en muestras cuyo contenido se conoce *a priori*, por haber sido obtenida mediante métodos de referencia adecuadamente validados (pesada, métodos basados en otro principio, etc.). Para obtener una mejor garantía de exactitud, se suele evaluar un número mayor de muestras que para otros métodos, de preferencia, procedentes de lotes o partidas distintos. Esto permite comprobar que las posibles variaciones entre lotes no afectan los resultados proporcionados por el método.

1.4.1.2. Precisión

La precisión de un método analítico está dada por el grado de concordancia o dispersión entre los resultados de ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a varias alícuotas de una muestra homogénea.⁵⁹ La precisión de un método analítico, que puede ser considerada a los niveles de repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad (Tabla I.4.4), generalmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones.

El nivel de exigencia de los resultados depende del tipo de muestra y del método utilizado. Para la validación de los métodos desarrollados en esta Tesis la precisión fue evaluada a los niveles de repetibilidad y precisión intermedia, ya que la reproducibilidad se debe validar para casos de ensayos interlaboratorios.

Tabla I.4.4. Niveles de evaluación de la precisión de un método analítico.

-
- Repetibilidad: Expresa la precisión bajo las mismas condiciones operativas en un intervalo de tiempo corto.
 - Precisión intermedia: Representa las variaciones intra-laboratorio, operando en diferentes días, con diferentes analistas, etc.
 - Reproducibilidad: Indica la precisión entre laboratorios y suele ser estudiada cuando se realizan estudios en colaboración.
-

La repetibilidad puede evaluarse empleando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el método o un mínimo de seis determinaciones al 100% del valor declarado. Por su parte, se recomienda que la precisión intermedia sea determinada realizando seis o nueve determinaciones a tres niveles de concentración durante dos o tres días distintos. Para su evaluación se usa el análisis de la variancia (ANOVA).

I.4.1.3. Especificidad

La especificidad de un método analítico representa su capacidad para evaluar inequívocamente al analito en presencia de otros componentes que pueden estar presentes en la muestra, tales como impurezas, productos de degradación, componentes de la matriz, etc. Algunas guías de validación usan el término selectividad en lugar de especificidad.⁵⁹

Para ensayos de identificación, la definición anteriormente enunciada implica asegurar la identidad del analito; sin embargo, para ensayos de pureza, esto implica asegurar que el método permita una determinación del contenido de impurezas, que no se vea afectada por otras impurezas o elementos de la matriz. Por otra parte, para determinaciones cuantitativas del analito principal (valoración), caso que representa el objetivo fundamental de este trabajo de Tesis, esto implica garantizar un resultado que permita establecer el contenido o riqueza del analito en la muestra que no sea afectado por posibles interferencias.

Cuando se utilizan métodos cromatográficos, la correcta separación entre los componentes de la muestra se utiliza para demostrar selectividad. Los ensayos de pureza de pico, obtenidos empleando detección con arreglo de diodos o espectrometría de masas, pueden ser útiles para demostrar que el pico cromatográfico del analito no incluye a otro componente.⁶¹

Para métodos poco selectivos, como es el caso de los espectrofotométricos, la falta de selectividad puede suplirse adicionando una segunda metodología ortogonal. En el caso de la asociación con métodos quimiométricos, el análisis de los residuos espectrales y el método de adición de estándar constituyen buenas opciones para la evaluación de este parámetro. El cálculo matemático de la selectividad también permite obtener información al respecto.⁶²

En ciertas situaciones particulares, la falta de especificidad de un método analítico puede ser compensada mediante el uso conjunto de procedimientos analíticos complementarios. El caso más evidente de esta práctica es la identificación farmacéutica oficial, que suele llevarse a cabo habitualmente mediante el empleo de al menos dos ensayos con diferente fundamento.

1.4.1.4. Límite de detección

El límite de detección representa la menor concentración del analito que puede detectarse en una muestra, pero no necesariamente cuantificarse, bajo condiciones experimentales pre-establecidas.⁵⁹

Este es un parámetro cuya evaluación es necesaria para métodos de análisis de impurezas y trazas, pudiendo ser requerido para el caso de métodos utilizados en ensayos de uniformidad de contenido y ensayos de disolución. La determinación de este parámetro depende de la naturaleza del método de análisis; se dispone de diversas aproximaciones para tal fin, como lo muestra la Tabla I.4.5.

Tabla I.4.5. Alternativas para la determinación del límite de detección.

-
- Inspección visual: Se usa en el caso de métodos no instrumentales, como CCD o valoraciones.
 - Cálculos estadísticos basados en la relación señal/ruido: Aplicables a métodos con línea de base, como cromatografías instrumentales.
 - Cálculos estadísticos basados en la desviación estándar de la respuesta: Pueden usarse valores determinados experimentalmente o bien parámetros de la curva de calibración o datos del blanco.
-

1.4.1.5. Límite de cuantificación

El límite de cuantificación es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud pre-determinadas en una muestra, bajo condiciones experimentales pre-establecidas.⁵⁹ Este parámetro se expresa en las unidades de concentración empleadas para el analito. Para su cálculo se suelen utilizar los mismos parámetros que para el caso del límite de detección, aunque con criterios de aceptación ligeramente distintos.

En el desarrollo de métodos siempre resulta conveniente asegurar que el intervalo de trabajo se encuentra por encima del límite de cuantificación. En modelos de calibración multivariable, la determinación de este parámetro se realiza mediante cálculos matemáticos que tienen en cuenta el ruido instrumental.

1.4.1.6. Linealidad e intervalo

La linealidad de un método analítico representa su capacidad de producir resultados directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo (rango) de trabajo dado.⁵⁹ Este último aspecto se refiere al intervalo de concentraciones del analito que pueden ser determinadas con precisión, exactitud y linealidad adecuadas. Habitualmente, el intervalo de trabajo se expresa con las mismas unidades que los resultados del ensayo y su

determinación se efectúa simultáneamente con la determinación de la linealidad.

La linealidad debe verificarse a lo largo de todo el intervalo del método analítico. La misma se debe establecer por medio de un método estadístico apropiado como el cálculo de regresión por cuadrados mínimos o una prueba F .⁶¹ El intervalo lineal de trabajo de un método se considera validado al comprobar que el método analítico es preciso, exacto y lineal, cuando es aplicado a muestras que contienen diferentes tenores del analito dentro de dicho intervalo.

La comprobación de la linealidad de un método multivariado puede hacerse adaptando lo propuesto en las guías ICH. Para ello, es recomendable realizar un mínimo de cinco determinaciones que cubran el intervalo de concentraciones del método, utilizando muestras de concentración conocida. Se representan los resultados proporcionados por el método frente a valores de referencia perfectamente conocidos, expresados en las mismas unidades; el requisito se cumple al obtener una recta de pendiente estadísticamente unitaria, que pasa por el origen del sistema de coordenadas usado.

1.4.1.7. Robustez

La robustez de un método analítico es una medida de su capacidad de permanecer inmune frente a variaciones pequeñas, pero deliberadas, en las variables críticas del mismo; este parámetro proporciona una indicación de su confiabilidad.⁵⁹ La robustez se expresa normalmente como la falta de influencia de dichas variables operativas y del entorno sobre los resultados del ensayo.

En el caso de métodos quimiométricos basados en el uso de datos espectroscópicos, el efecto de pequeñas variaciones en el tamaño del espectro sobre la funcionalidad del método brinda una idea de su robustez con respecto al intervalo espectral empleado.

I.5. QUIMIOMETRÍA

La Quimiometría es una sub-disciplina de la Química que tomó gran impulso en la década de los 90. Esta puede definirse como una rama de la Química que utiliza de forma lógica el álgebra matricial, la estadística y otros métodos para diseñar o seleccionar procedimientos óptimos de medida y experimentación con el objeto de extraer la información más relevante contenida en los datos experimentales.⁶³ Los avances instrumentales, la automatización y la incorporación de las computadoras en el control y adquisición de señales provenientes de instrumentos, permite obtener gran cantidad de información analítica en tiempos muy cortos. Poder separar y extraer la información útil de la que no lo es y ser capaz de interpretar los datos para que puedan ser utilizados y relacionados con el parámetro a determinar, se convierte en una tarea compleja dado el gran volumen de información. Esta problemática ha propiciado el desarrollo de diferentes métodos analíticos denominados quimiométricos. La aplicación de métodos quimiométricos a problemas farmacéuticos es actualmente un área de fértil desarrollo y febril actividad.⁶⁴

I.5.1. Técnicas Quimiométricas de Clasificación

Las técnicas quimiométricas utilizadas en problemas de análisis cualitativo se conocen de forma general con el nombre de Métodos de Reconocimiento de Pautas (MRP).⁶⁵ Este conjunto de herramientas permite establecer agrupaciones de muestras en función de características comunes o relaciones que existan entre ellas o bien definir criterios para clasificar muestras desconocidas.⁶⁶

Estas técnicas quimiométricas han sido ampliamente aplicadas a la resolución de distintos problemas de clasificación, empleando ya sea características o magnitudes físicas de las muestras.

La mayoría de los MRP se fundamenta en la determinación de la similitud y la manera

más común de expresar la similitud es a través de medidas de correlación o distancias. Las medidas de correlación se basan en el cálculo del coeficiente de correlación entre dos muestras, que oscila entre -1 y 1 . En este caso, los valores unitarios indican coincidencia total entre los dos vectores (espectros en el IR, perfiles de disolución, voltamperogramas, etc).⁶⁷

Por su parte, las medidas de distancia se basan en el cálculo de una variable que representa cuán diferente es una muestra de otra o bien cuál es la diferencia entre la muestra y puntos en el espacio que representan los modelos de una clase. El cálculo de la distancia D entre una muestra x_i y el centroide de una clase cuya matriz de dispersión de los datos alrededor del centroide es Φ , depende del valor que adopte esta matriz de dispersión.⁶⁸ En un caso particular, cuando Φ^{-1} representa la inversa de la matriz de variancia-covariancia, la distancia es conocida como Distancia de Mahalanobis (MD). La morfología de estas clases es elipsoidal, con elipsoides que presentan formas, tamaños y orientaciones diferentes.

Por su parte, los MRP se clasifican en métodos supervisados y métodos no supervisados, según se conozca o no la pertenencia de los objetos a clases determinadas.

1.5.1.1. Métodos no supervisados

Estos se basan en descubrir agrupaciones de pautas en un espacio de N-dimensiones sin saber *a priori* a qué clase pertenece cada muestra. Entre los métodos más comunes de este tipo incluyen el Análisis de Categorías (en inglés, CA, *Cluster Analysis*),⁶⁹ Árbol de Mínimo Desarrollo (en inglés, MST, *Minimal Spanning Tree*)⁷⁰ y Mapas Auto-organizables (en inglés, SOM, *Self-Organizing Maps*) de Kohonen.⁷¹

1.5.1.2. Métodos supervisados

En estos métodos, la clasificación se basa en un aprendizaje previo del sistema, con conjuntos de calibración o entrenamiento de objetos que permiten definir cada clase, ya que

estos objetos son de conocida pertenencia a una de las clases. La calidad de los resultados de la clasificación vendrá influenciada por la calidad de los conjuntos de entrenamiento.

Estos métodos pueden ser divididos a su vez en dos subgrupos: métodos discriminantes y métodos de modelado.⁷² Los métodos discriminantes dividen el espacio en tantas regiones como clases haya en el conjunto de entrenamiento, creando límites compartidos por los espacios; por ello, toda muestra desconocida siempre podrá ser clasificada como perteneciente a una de las clases. Los más comunes son: Análisis Discriminante (en inglés, DA, *Discriminant Analysis*) y Vecino k más Cercano (en inglés, KNN, *k-Nearest Neighbour*).^{63b,73}

Por su parte, los métodos de modelado se basan en la creación de volúmenes en el espacio, cada uno de los cuales presenta límites para cada una de las clases. Por ello, una muestra puede clasificarse como perteneciente a alguna de las clases o a ninguna de ellas. Entre estos métodos se cuentan el Reconocimiento de Pautas mediante Análisis Independiente Multicategorico (en inglés, PRIMA, *Pattern Recognition by Independent Multicategory Analysis*),⁷⁴ las Clases Desigualmente Dispersas (en inglés, UNEQ, *Unequal Dispersed Classes*),⁷⁵ el Modelado Blando Independiente de Analogías de Clases (en inglés, SIMCA, *Soft Independent Modelling of Class Analogy*),⁷⁶ que es probablemente el más conocido y las Redes Neuronales Artificiales Supervisadas (en inglés, SANN, *Supervised Artificial Neural Networks*).⁷⁷

1.5.2. Técnicas de Reducción de la Dimensionalidad

Debido a la cantidad de información que proporcionan los métodos instrumentales, uno de los campos de estudio de la quimiometría ha sido el desarrollo de métodos de cálculo capaces de reducir este gran volumen de información para que ésta permanezca representada, sin pérdidas relevantes, mediante un número reducido de variables. Uno de los métodos más utilizados para efectuar la reducción de variables es la descomposición de los datos en sus

componentes principales, mediante el Análisis de Componentes Principales (PCA).⁷⁸

I.5.2.1. Tratamiento previo de los datos

Los procedimientos de reducción de variables no suelen ser aplicados a los datos originales, sino que éstos suelen ser previamente tratados para eliminar posibles efectos que puedan afectar la descomposición. Los pre-tratamientos más habituales son el centrado en la media⁷⁹ y el auto-escalado, cuyos efectos han sido discutidos en la bibliografía.⁸⁰ La remoción de datos discordantes también debe ser efectuada como pre-tratamiento, a los fines de evitar resultados erróneos.

Considerando una matriz \mathbf{X} de datos donde cada fila corresponde al espectro de una muestra y cada columna corresponde a una longitud de onda (variable) de los espectros de las muestras, el centrado y el auto-escalado transforman esta matriz por medio de las operaciones que se consignan en la Tabla I.5.1.

Tabla I.5.1. Pre-tratamiento de datos. Operaciones de centrado y auto-escalado.

-
- Centrado: Se calcula el valor promedio de cada variable \bar{x}_k del conjunto de calibración (cada columna de la matriz) y se resta este valor a cada punto x_{ik} de la columna.
 - Auto-escalado: Resulta de dividir la matriz centrada por la desviación estándar de la misma, S_k . Asegura que la variancia de cada variable sea unitaria. Esta transformación puede favorecer la determinación de compuestos minoritarios en presencia de otros mayoritarios. Se realiza luego del centrado.
-

Por su parte, la remoción de datos discordantes se refiere a la eliminación de vectores que presentan una gran diferencia con respecto a sus congéneres, ya sea por causas aleatorias o asignables, que pueden resultar en la modificación de la proyección de los datos sobre el nuevo espacio que se producirá luego de la reducción de variables. Por ello, la remoción de

dichos datos es fundamental para asegurar el correcto procedimiento de la reducción. Una técnica muy utilizada para la identificación de dicho tipo de muestras es el cómputo de la distancia de Mahalanobis,⁸¹ asociado con el cálculo de una probabilidad.⁸²

Cabe destacar que no existe una estrategia universal de pre-tratamiento de datos, ya que frente a cada problema concreto se debe adoptar la solución más conveniente.

1.5.2.2. Análisis de Componentes Principales (PCA)

PCA es sin duda la estrategia de reducción de la dimensionalidad más difundida, existiendo varios algoritmos capaces de estimar los componentes principales de una matriz; los más conocidos son la Descomposición en Valores Singulares (SVD)^{82,83} y el NIPALS (del inglés, *Nonlinear Iterative Partial Least Squares*).⁸⁴

El objetivo y funcionamiento de PCA se pueden ilustrar a partir de una matriz conformada por vectores con k variables (como por ejemplo, el espectro UV o IR de una muestra registrada a k longitudes de onda diferentes, o un voltamograma). Con ellos se puede construir un espacio de k dimensiones; si se tienen m muestras, cada una de ellas se puede representar como un punto en dicho espacio de k dimensiones. Si estas muestras no tienen nada en común aparecerán dispersas en el espacio; si por el contrario tienen algo en común o están relacionadas, los m puntos aparecerán agrupados.

El objetivo de PCA es hallar las direcciones en el espacio que explican la máxima variabilidad de las muestras y utilizarlas como nuevos ejes de coordenadas, denominados componentes principales (PCs), reduciendo de ese modo la dimensionalidad de ese espacio de k dimensiones a la de un espacio de a dimensiones, donde $a < k$, manteniendo a su vez esencialmente intacta la información relevante del sistema.

En términos geométricos, PCA puede representarse como un proceso de cambio de ejes, mediante el cual las muestras son dispuestas en un nuevo sistema de coordenadas con un

número inferior de ejes al utilizado inicialmente.

En PCA, el primer componente principal resulta de la combinación lineal de las k variables que explican la máxima variabilidad de las muestras. El segundo PC se escoge de forma tal que sea ortogonal al primero y que, a su vez, explique la máxima variabilidad de las muestras una vez restada la variabilidad explicada por el primer PC, y así sucesivamente.

Para definir matemáticamente estos nuevos ejes se utilizan las “cargas” (en inglés, *loadings*) y los “tantos” (en inglés, *scores*). Las cargas son los cosenos de los ángulos que forman los nuevos ejes con los ejes originales, mientras que los tantos son las coordenadas de las muestras en estos nuevos ejes.

Consignando el problema de una manera algebraica, la matriz de datos \mathbf{X} ($m \times k$) puede descomponerse en el producto de dos matrices que se muestra en la Ecuación I.3; una matriz de *tantos* \mathbf{T} y una matriz de *cargas* \mathbf{V} , quedando un residual representado por la matriz de error \mathbf{E} .

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \mathbf{V}' + \mathbf{E} \quad [\text{I.3}]$$

La representación completa de la matriz \mathbf{X} implica utilizar k vectores de cargas y de tantos. Sin embargo, puesto que la finalidad de la descomposición es la reducción de la dimensionalidad del sistema y los primeros PCs describen las más importantes fuentes de variación de los datos, la matriz original puede representarse sin pérdida significativa de la información, con un número menor de vectores ($a < k$) de la forma que se muestra en la Ecuación I.4.

$$\mathbf{X} = \mathbf{t}_1 \mathbf{v}_1' + \mathbf{t}_2 \mathbf{v}_2' + \dots + \mathbf{t}_a \mathbf{v}_a' + \mathbf{E} \quad [\text{I.4}]$$

El conjunto de datos \mathbf{X} , descrito inicialmente por medio de variables correlacionadas,

queda de esta forma definido por un nuevo conjunto de variables (PCs) no correlacionadas entre sí, en un nuevo sistema de ejes ortogonales.

El algoritmo elegido para efectuar la descomposición de los datos en este trabajo de Tesis fue el de Descomposición en Valores Singulares (SVD), anteriormente mencionado. El mismo descompone la matriz centrada \mathbf{Xc} , proveniente de \mathbf{X} , en el producto de tres matrices más pequeñas denominadas \mathbf{U} , \mathbf{S} y \mathbf{V} . La matriz \mathbf{U} contiene los valores de la matriz de tantos sin ponderar. Por su parte, la matriz \mathbf{S} es una matriz diagonal que contiene los valores singulares de la matriz \mathbf{X} , los cuales corresponden a los factores de ponderación de los componentes de \mathbf{U} . Finalmente, \mathbf{V} es la matriz de vectores cargas de la matriz \mathbf{X} , como se muestra en las ecuaciones I.5 y I.6, siendo \mathbf{T} y \mathbf{V} las mismas anteriormente detalladas.⁸⁵

$$\mathbf{Xc} = \mathbf{U} \mathbf{S} \mathbf{V}' \quad [\text{I.5}]$$

$$\mathbf{T} = \mathbf{U} \mathbf{S} \quad [\text{I.6}]$$

I.5.2.3. Redes neuronales de Kohonen – Mapas auto-organizables

Las redes neuronales de Kohonen o Mapas Auto-organizables (SOM),⁸⁶ son algoritmos capaces de llevar a cabo una reducción cualitativa de la dimensionalidad, cuyo resultado es un mapa bidimensional sobre el cual se proyectan todos los componentes de la matriz analizada. Estos algoritmos pertenecen a la categoría de redes competitivas, es decir, redes con aprendizaje no supervisado de tipo competitivo. Las mismas poseen una arquitectura de dos capas (entrada-salida), con un solo nivel de conexiones, funciones de activación lineales y flujo de información unidireccional, lo que las convierte en redes en cascada.^{71a,b;87}

Al aplicar un patrón de entrada, el algoritmo permite calcular alguna medida de similitud o disimilitud, como por ejemplo producto interno, distancia euclidiana o de Mahalanobis, etc., entre las entradas y los pesos de las conexiones. En el caso de la distancia

euclidiana, la fórmula de cálculo se consigna en la Ecuación I.7.

$$D_j = \sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - w_{ij})^2} \quad [I.7]$$

donde x_i son las n componentes del vector de entrada \mathbf{x}_n , y w_{ij} son los componentes de \mathbf{w}_j , que representa el vector de pesos de la j -ésima neurona del mapa. La unidad de salida con los pesos más parecidos al patrón de entrada, es decir la de menor D_j , es declarada ganadora o unidad con el mejor parecido (BMU). Como consecuencia de ello, el vector de pesos \mathbf{w}_j de la BMU se convierte en \mathbf{w}_c , el centro de un grupo de vectores cercanos a él.

En una instancia siguiente, se modifican los pesos de los vectores de pesos \mathbf{w}_j “ceranos” a \mathbf{w}_c . Este último también se modifica, sufriendo un incremento $\Delta\mathbf{w}_j$, el cual se calcula según la fórmula de la Ecuación I.8.

$$\Delta\mathbf{w}_j = \eta (\mathbf{x}_n - \mathbf{w}_j) \quad [I.8]$$

donde η es una pequeña constante positiva. De esta manera se consigue que los vectores de pesos de la unidad ganadora y de su “vecindario” se parezcan cada vez más al patrón de entrada que hace ganar a esa unidad.

Una de las opciones más utilizadas es seleccionar $\eta = 1/m$, siendo m el número de iteraciones del proceso de aprendizaje. La cuantía de la adaptación según su ubicación, se puede escalar de acuerdo a una “función de vecindad” pre-establecida $\Lambda_{(j,c)}$, según se muestra en la Ecuación I.9.

$$\Delta\mathbf{w}_j = \eta \Lambda_{(j,c)} (\mathbf{x}_n - \mathbf{w}_j) \quad [I.9]$$

donde c es el índice de la unidad ganadora que representa la posición de la neurona j en el espacio de salida y tiene su máximo para $j = c$. La convergencia del mapa depende de escoger

apropiadamente el valor de j . Los pasos se repiten para todos los patrones de entrada \mathbf{x}_n , efectuando un número m de iteraciones. La unidad de salida ganadora para cada grupo de entradas no se conoce *a priori*, siendo necesario averiguarlo después de entrenar la red.

Una de las cualidades de este tipo de redes es la incorporación a la regla de aprendizaje de cierto grado de sensibilidad con respecto al vecindario o la historia; esto hace que todas las neuronas que no aprenden sean desplazadas, aumentando así la capacidad del sistema de extraer o forjar un mapa de características topológicas, a partir de los datos.

En suma, la red transporta el espacio de entrada de los datos hacia un espacio de salida con un cierto orden topológico, el cual finalmente es posicionado en un mapa. Para que este orden se conserve al entrenar la red, Kohonen propuso un método cuya clave reside en reducir el tamaño del vecindario de la unidad ganadora en cada iteración.⁸⁸

1.5.3. Técnicas Quimiométricas para el Análisis Cuantitativo

La mayor parte de los métodos instrumentales de análisis son métodos secundarios, de tipo comparativo o relativo. Ello implica que para determinar la cantidad de analito en una muestra, debe compararse la señal del mismo con las respuestas producidas por una serie de patrones de composición conocida, con las que se construyó previamente un modelo, en las mismas condiciones de medida.

En consecuencia, en todo proceso analítico cuantitativo debe efectuarse como primer paso una calibración, la cual actúa de vínculo entre las señales instrumentales registradas y la cantidad de analito presente en muestras de referencia o patrones. La función de calibración, que debe responder a un principio teórico conocido (por ejemplo, Ley de Beer, Ecuación de Nernst, Ecuación de Ilcovic, etc.),⁸⁹ ajusta un modelo matemático a los datos obtenidos en condiciones experimentales precisas, las que deben repetirse durante la cuantificación, a los efectos de que el modelo de calibración provea resultados confiables. La calidad de una

calibración puede evaluarse mediante indicadores estadísticos.

Las técnicas espectroscópicas, las electroquímicas y las cromatografías instrumentales con sus respectivas asociaciones son capaces de proporcionar un gran número de variables respuesta para cada muestra, las cuales en general no siempre corresponden a un único analito. Esto ha propiciado el desarrollo de métodos de calibración capaces de aislar la contribución del analito a la señal analizada, ya sea por el análisis de múltiples variables o por la diferenciación de las señales analíticas. Los métodos más comúnmente empleados se discuten a continuación.

1.5.3.1. Espectrofotometría de derivadas

La espectrofotometría de derivadas es una parte de la espectroscopia, que involucra el trabajo analítico con derivadas de orden uno, dos o mayor (D^1 , D^2 , etc.) de espectros normales provenientes de espectrofotómetros (UV-Vis, IR, NIR, etc.).⁹⁰ En este contexto, el espectro de orden cero hace referencia al espectro de absorción fundamental o normal (D^0).

La derivación del espectro normal puede emplearse también como una técnica de pre-procesamiento espectral con el objeto de mejorar la calidad de la información analítica que el mismo contiene.⁹¹ En ambos casos, el algoritmo más empleado para realizar conjuntamente el “suavizado” y la derivación espectral es el desarrollado por Savitzky-Golay.⁹²

La primera derivada (D^1) de un espectro se caracteriza por contener un cruce de cero a la misma longitud de onda a la cual el espectro original (D^0) presenta un extremo relativo (máximo o mínimo). Los valores máximos y mínimos para la pendiente en el espectro D^0 corresponden respectivamente a máximos y mínimos en D^1 .

Es así que la primera derivada de un espectro de absorción que presenta una única banda con forma de curva gaussiana está caracterizada por un máximo, un mínimo y un cruce de cero, que corresponde a la longitud de onda de máxima absorción (λ_{\max}). Por su parte, la

segunda derivada de un espectro con estos rasgos está caracterizada por dos picos satélites y una banda invertida, cuyo extremo corresponde a la λ_{\max} del espectro original.

Existen varias ventajas destacables en el espectro derivado de una mezcla con respecto al espectro de orden cero, el primero de los cuales es que actúa corrigiendo la línea de base.⁹³ Por otra parte, al disminuir el solapamiento de las bandas de absorción del espectro fundamental, el espectro derivado presenta mejor resolución y provee un realce de la selectividad, lo que permite incrementar la visualización de detalles menores. Todo esto hace posible en algunos casos la determinación de los analitos en una mezcla de manera individual utilizando las propiedades de los espectros derivados a λ_{\max} del espectro normal.

Además, dependiendo de la forma de las bandas de absorción, puede lograrse una mejor discriminación en favor de la banda más débil. Todas estas ventajas propenden a que esta metodología pueda resolver mezclas que la espectrofotometría clásica es incapaz de hacer.

Si los analitos cumplen con la Ley de Beer, las amplitudes de las señales de un espectro de derivadas también mostrarán cumplimiento de dicha ley, mejorándose la resolución y la discriminación con el orden de la derivada. Sin embargo, debe tenerse en cuenta el ruido instrumental y el hecho de que la derivación disminuye la relación señal/ruido y la intensidad de la señal, de modo tal que las derivadas de mayor orden resultan las más perjudicadas.

En consecuencia, por razones prácticas, no es conveniente trabajar más allá de la cuarta derivada. Por ello, la mayoría de los paquetes informáticos comerciales disponibles para los espectrofotómetros UV-Visible modernos, rara vez permiten el cálculo de derivadas de orden superior a D^4 . Por otra parte, debe destacarse que para fines cuantitativos, en el control de calidad de medicamentos los espectros D^1 , D^2 y D^4 son los más utilizados, aparte del espectro normal.⁹⁴

La técnica de cruce del cero puede ser convenientemente utilizada para cuantificar analitos en mezclas. Para ello, durante la etapa de calibración, se construye un modelo de

regresión entre el valor de la derivada de interés de la respuesta instrumental para un dado analito, a la longitud de onda a la cual la contribución del resto de los componentes de la muestra es nula, en función de la concentración del analito de interés.⁹⁵

La derivación puede emplearse como técnica de pre-procesamiento de datos al usarse en conjunción con métodos quimiométricos. Algunas ventajas propias de esta estrategia han convertido la derivación en la metodología de elección en casos específicos.⁹⁶

Otra técnica, algo menos difundida pero sumamente útil para el control de calidad de medicamentos, es la que hace uso de la Derivada de la Razón Espectral (DRE).⁹⁷ Esta consiste en dividir sucesivamente el espectro fundamental (D^0) por cada uno de los espectros correspondientes a los componentes de la mezcla, salvo el analito de interés. El espectro cociente así obtenido es luego derivado, lográndose de este modo aislar la contribución del analito al espectro.

La señal analítica se logra aislar debido a que al dividir dos espectros de un mismo componente puro se obtiene un trazado de intensidad constante, cuya derivada es cero. Este valor de derivada refleja la manera de anular la contribución al espectro de todos los componentes contemplados, que no son el analito de interés.

1.5.3.2. Calibración multivariada

Las técnicas de calibración están relacionadas con la forma de clasificación de los propios instrumentos analíticos, que son los que proporcionan la información básica para cuantificar el o los componentes de interés en una muestra.⁹⁸ Todos los instrumentos analíticos pueden ser clasificados de acuerdo al tipo de datos que proveen. Usando terminología matemática, propia del álgebra tensorial, los instrumentos o las técnicas pueden clasificarse según se detalla en la Tabla I.5.2.

Tabla I.5.2. Clasificación de los métodos analíticos según el tipo de datos que proveen.

-
- Orden cero: Generan un solo dato por muestra (un único número es un tensor de orden cero), como por ejemplo los resultados de electrodos selectivos de iones.
 - Orden uno: Capaces de producir múltiples medidas para cada muestra; proveen un vector de datos para cada muestra e incluyen datos de espectrómetros y cromatógrafos.
 - Orden dos: Pueden generar una matriz de datos por muestra. Se identifican con técnicas tales como la resonancia magnética nuclear bidimensional, matrices de excitación-emisión en espectrofluorometría y técnicas acopladas, como por ejemplo GC-MS, espectrometría de masas-espectrometría de masas (MS-MS), cromatografía de gases-espectrofotometría en el infrarrojo (GC-IR) y cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS).
 - Orden superior: Es posible desarrollar técnicas que generan un cubo (orden tres) o un hipercubo de datos por muestra,⁹⁹ como las matrices de excitación-emisión propias de la espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo. No existe límite máximo teórico para el orden de datos instrumentales.
-

Los datos multivariados son más ricos en información que los datos provistos por instrumentos de orden cero, la cual puede ser analizada mediante métodos de calibración multivariada apropiados. Los instrumentos que proveen este tipo de señales se constituyen entonces en una herramienta analítica mucho más poderosa que aquéllos que proporcionan sólo datos de orden cero.

En la Tabla I.5.3 se muestra un detalle de los métodos multivariados más comunes y sus características fundamentales.¹⁰⁰ Por su versatilidad y gran eficiencia, entre las metodologías multivariados aplicables a datos emergentes de instrumentos de primer orden, el método de Cuadrados Mínimos Parciales (PLS) continúa siendo el más ampliamente difundido para resolver problemas con datos provenientes de espectrofotómetros.

Debido a su valor práctico, a continuación se detallan las características del funcionamiento de PLS.

Tabla I.5.3. Clasificación de los métodos analíticos según la calidad de los datos.

Clasificación	Orden de la muestra	Conjunto de datos	Método	Ventaja de orden superior
Univariado	Orden cero	Una vía	Regresión lineal	No
	Orden uno	Dos vías	PCR, PLS, CLS, ILS	No
Multivariado	Orden dos desdoblados a primer orden	Dos vías	PCR Desdoblado	No
			PLS Desdoblado	No
	Orden dos	Tres vías	PARAFAC	Si
			PLS-RBL	Si
			BLLS	Si
			SWATLD	Si

1.5.3.2.A. Método de cuadrados mínimos parciales (PLS)

El método de regresión de Cuadrados Mínimos Parciales (PLS) fue desarrollado por H. Wold en 1975.¹⁰¹ La principal ventaja con respecto a su antecesor, la Regresión sobre Componentes Principales (PCR), radica en el hecho de que PLS intenta almacenar la mayor información posible para la predicción del analito en los primeros componentes principales. Para ello, durante la etapa de calibración, el algoritmo PLS utiliza tanto la información contenida en la matriz de señal (matriz **A**) como la información contenida en la matriz de la propiedad a determinar (matriz **C**), mediante el uso de variables auxiliares llamadas variables latentes (LVs), factores o componentes PLS.

Existen dos tipos o variantes de métodos PLS. El método PLS1, que concentra su atención en un único analito por vez y otro denominado PLS2 que permite calibrar y predecir las concentraciones de varios analitos simultáneamente. La desventaja del algoritmo PLS2 con respecto a PLS1 reside en que analitos cuya concentración es pobremente predecible, transfieren su error en la predicción a aquéllos que son más fidedignamente evaluables.

Teniendo en cuenta que las aplicaciones estudiadas en este trabajo de Tesis se refieren a

productos de interés farmacéutico donde la aplicación de PLS1 es ventajosa, el desarrollo teórico que sigue corresponde al del algoritmo PLS1 (denominado de aquí en adelante simplemente PLS).

Dada una matriz espectral \mathbf{A} ($n \times m$), donde n es igual al número de muestras (N) cuyos espectros han sido adquiridos a m sensores (longitudes de onda) diferentes y una matriz \mathbf{C} ($n \times 1$) conteniendo las concentraciones conocidas del analito de interés en las n muestras, el algoritmo PLS descompone \mathbf{A} y \mathbf{C} en sendos productos de dos matrices más pequeñas (Ecuaciones I.10 y I.11), las que contienen la información más relevante de los datos originales, y sendas matrices de error. Estas matrices pueden ser reconstituidas mediante el uso de a LVs, siendo a el número óptimo de LVs PLS requeridas para la calibración, donde $a \leq m$.

$$\mathbf{A} = \mathbf{T} \mathbf{B} + \mathbf{E} \quad [\text{I.10}]$$

$$\mathbf{C} = \mathbf{U} \mathbf{Q} + \mathbf{F} \quad [\text{I.11}]$$

En estas ecuaciones, \mathbf{T} ($n \times a$) y \mathbf{U} ($n \times a$) son las matrices de “tantos” de los datos, \mathbf{B} ($a \times m$) y \mathbf{Q} ($a \times 1$) son las matrices de “cargas” de \mathbf{A} y \mathbf{C} , y por último \mathbf{E} ($n \times m$) y \mathbf{F} ($n \times 1$) son las matrices de los residuos de las señales y de concentración del modelo, respectivamente, cuando se emplean a LVs.

$$\mathbf{A}^+ = \mathbf{w} (\mathbf{b} \mathbf{w})^{-1} (\mathbf{T}' \mathbf{T})^{-1} \mathbf{T}' \quad [\text{I.12}]$$

La Figura I.5.1 muestra una forma esquemática del funcionamiento del algoritmo PLS. Durante la etapa de la calibración, las ecuaciones anteriores son resueltas por el método de cuadrados mínimos.

Un vector de ponderación \mathbf{w} relaciona \mathbf{U} con \mathbf{A} y un vector \mathbf{b} relaciona \mathbf{U} con \mathbf{T}

(relación interna del PLS), dando lugar a la matriz pseudoinversa \mathbf{A}^+ definida por la Ecuación I.12.

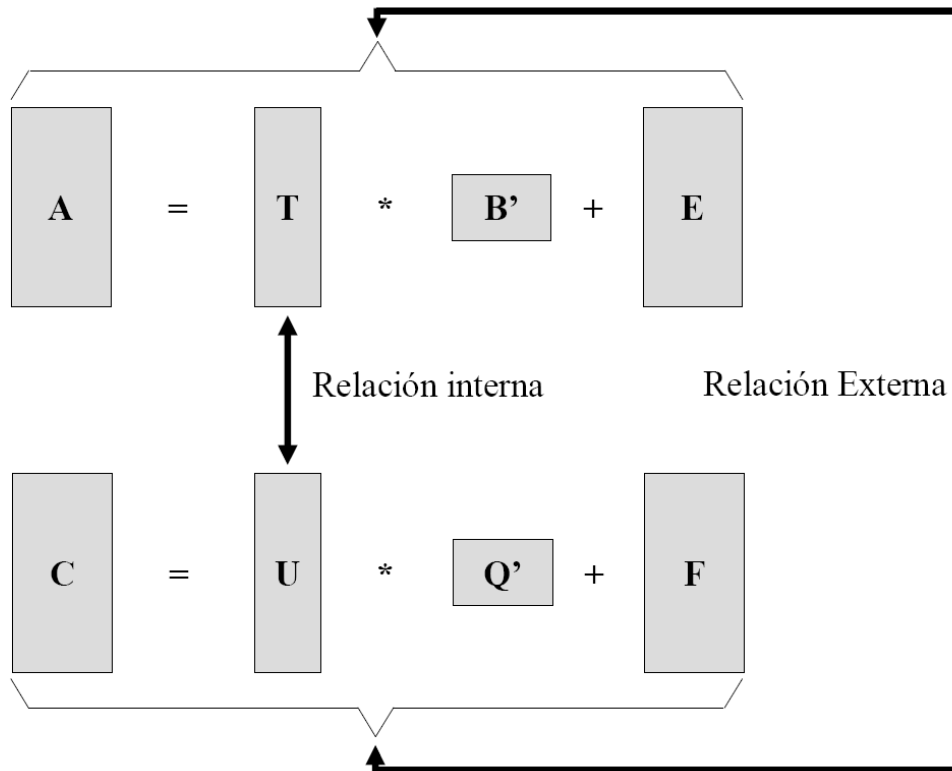


Figura I.5.1. Relación entre las matrices utilizadas por el algoritmo PLS.

Para la predicción de la concentración c de una muestra desconocida a partir de su espectro \mathbf{a} se aplica la Ecuación I.13, donde \mathbf{b} es el vector que contiene los coeficientes de regresión de la calibración.

$$c = \mathbf{C}' \mathbf{A}^+ \mathbf{a} = \mathbf{b}' \mathbf{a} \quad [\text{I.13}]$$

La principal ventaja de PLS reside en que éste no requiere conocer previamente los espectros individuales de cada analito o interferente, ni las concentraciones de los mismos, aunque ambos deben ser modelados, a diferencia de métodos como regresión de Cuadrados

Mínimos Clásicos (en inglés, CLS, *Cassical Least Squares*), que requieren el conocimiento de las concentraciones de cada uno de los componentes de la muestra, incluyendo los interferentes.¹⁰²

Otros beneficios adicionales de PLS incluyen su inmunidad frente a colinealidades, lo que no ocurre con otras metodologías como la regresión de Cuadrados Mínimos Inversos (en inglés, ILS, *Inverse Least Squares*). Además, PLS efectúa una descomposición matricial dirigida a favor de la concentración del analito a cuantificar y presenta capacidad de utilizar información tanto de los espectros de las muestras como de sus concentraciones, aventajando en este sentido a la regresión sobre componentes principales, que sólo capta información espectral.

Por ello, PLS ha sido aplicado exitosamente en el análisis farmacéutico de mezclas complejas con múltiples componentes.¹⁰³ Este algoritmo ha sido el empleado en buena parte de las calibraciones multivariadas de los trabajos que conforman esta Tesis.

1.5.3.2.A.1. Validación interna y optimización de modelos PLS

Como se señaló anteriormente, todos los métodos analíticos cuantitativos secundarios tienen en común una etapa de calibración, la que generalmente se lleva a cabo utilizando un conjunto de muestras de entrenamiento (en inglés, *training set*), las cuales contienen los analitos de interés en concentraciones que están dentro del intervalo lineal de respuesta instrumental, y una posterior etapa de predicción, donde los resultados del modelo generado en la calibración son usados para estimar la concentración de muestras incógnitas a partir de la información generada por el instrumento.

Previo a la etapa de predicción es necesario evaluar la capacidad del modelo para predecir el analito en nuevas mezclas. Esta evaluación puede realizarse por medio de un conjunto externo de monitoreo (en inglés, *monitoring set*) o por medio de una metodología

interna, que emplea el mismo conjunto de entrenamiento. Esta última estrategia se conoce con el nombre de validación cruzada (en inglés, *cross-validation*). Se dispone de diversas alternativas para realizar la validación cruzada; particularmente útil en este sentido es el procedimiento conocido como “dejar uno afuera” (en inglés, *leave-one-out*).^{103d}

Para un conjunto de N muestras, este protocolo de trabajo consiste en dejar de lado una de las muestras, construir un modelo de calibración con las $N-1$ muestras restantes y predecir la concentración de la muestra apartada empleando el modelo así construido. Repitiendo el procedimiento hasta que todas las muestras han sido dejadas de lado una vez, como se ve en la Figura I.5.2, se puede calcular el error en la predicción, el cual puede expresarse como la Suma de Cuadrados del Error Residual en la Predicción (PRESS), según se indica en la Ecuación I.14. El uso de la validación interna reduce el número de muestras necesarias para el proceso de calibración, ya que plantea la posibilidad de prescindir del conjunto de monitoreo.

$$\text{PRESS} = \sum_{i=1}^N (c_{i(\text{pred})} - c_{i(\text{real})})^2 \quad [\text{I.14}]$$

Por otra parte, siendo PLS un método de factorización en variables latentes, debe determinarse el número óptimo de dichas LVs a emplear; éstas deben ser capaces de concentrar la mayor proporción de información posible, relacionada de alguna manera con las fuentes de variación, a la vez que dejar la mayor parte del ruido del sistema fuera del modelo.

Es de esperar que el número de LVs se relacione con los factores que producen la mayor variación espectral, siendo la concentración de los analitos en la mezcla la principal fuente de dicha variación. Sin embargo, interacciones entre analitos, deriva de la línea de base, apartamientos de la linealidad de la respuesta instrumental y presencia de otros componentes, también son causa de aumento del número de LVs.

Una aproximación con fundamento para la selección del número óptimo de LVs consiste en emplear el criterio del mínimo error de predicción (o mínimo PRESS); ello

implica realizar una relación de compromiso entre el número de LVs y la variación del estimador PRESS.

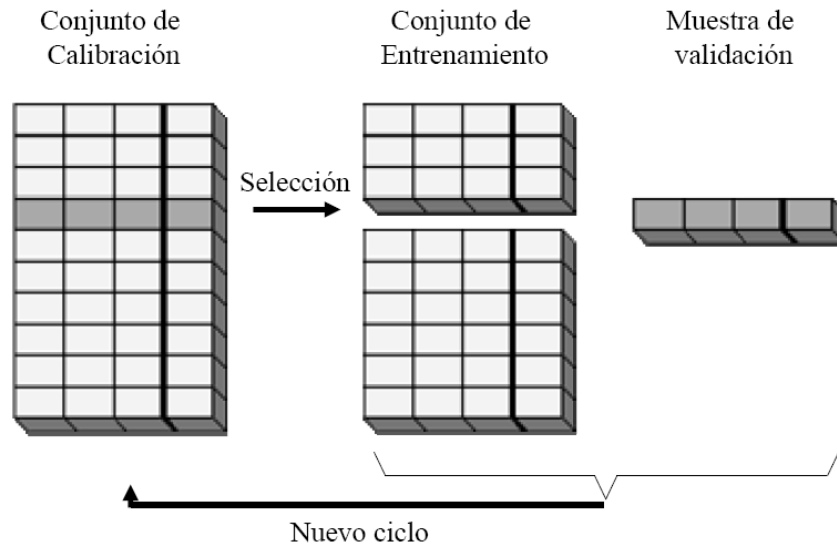


Figura I.5.2. Funcionamiento de la estrategia de “dejar uno afuera”.

Esto debe necesariamente llevarse a cabo de manera racional, ya que de utilizar un número excesivo de LVs se corre el riesgo de producir un “sobre-ajuste” (en inglés, *overfitting*), que resulta tan perjudicial como el uso de un número insuficiente de LVs, que eventualmente puede llevar a un ajuste deficiente (en inglés, *underfitting*).¹⁰⁴

La relación que se representa en la Ecuación I.15, donde h^* es el número de LVs que produce el primer mínimo de la función PRESS vs. Número de LVs y h es un número menor o igual que h^* , muestra la obtención del cociente $F(h)$. Este cociente se usa para decidir el número de LVs a emplear, seleccionándose el menor número de LVs tal que la función $F(h)$ sea mayor que una F de Snedecor, que acumule una probabilidad de 0,75 (75%) con h y h^* grados de libertad.¹⁰⁵

$$F(h) = \text{PRESS}(h)/\text{PRESS}(h^*) \quad [\text{I.15}]$$

En estas condiciones, puede afirmarse que la introducción de una nueva variable latente

no mejorará significativamente la calidad de la predicción. Por otra parte, un número creciente de LVs no necesariamente conducirá a una constante disminución del PRESS, ya que una vez que el modelado del ruido comienza a ser preponderante en relación al modelado de la señal, el valor de PRESS suele variar de manera impredecible; de ahí la importancia de utilizar el primer mínimo de la relación PRESS vs. número de LVs para aplicar la Ecuación I.5.4.

Tabla I.5.4. Parámetros de evaluación estadística de la calidad de una calibración.

-
- RMSD: Puede utilizarse tanto en calibración (RMSEC) como en predicción (RMSEP), ya que es un estimador del error absoluto de predicción y su valor se relaciona con el de PRESS; para el caso de N muestras, se expresa según la Ecuación I.16.
 - r^2 : Es el cuadrado del coeficiente de correlación, que indica el grado de correlación entre las concentraciones reales y las predichas y se calcula según la Ecuación I.5.17.
 - REP (%): Es el error relativo porcentual de la predicción, y califica la capacidad de predicción de un modelo. También puede aplicarse, bajo la forma de REC (%) para evaluar condiciones de calibración. Se calcula como se muestra en la Ecuación I.18.
-

Asimismo, para un número N de muestras utilizadas, la calidad de la calibración puede evaluarse a partir del valor promedio de las concentraciones reales (c_{med}) y los valores de concentraciones predichas (c_{pred}), comparados con los correspondientes valores asumidos como verdaderos (c_{real}), mediante el empleo de una serie de parámetros estadísticos auxiliares, como los detallados en la Tabla 1.15, cuyas fórmulas de cálculo se consignan en las Ecuaciones I.16-I.18, respectivamente.

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (c_{i(\text{pred})} - c_{i(\text{real})})^2} = \sqrt{\text{PRESS}/N} \quad [\text{I.16}]$$

$$r^2 = 1 - \left[\sum_{i=1}^N \frac{(c_{i(\text{pred})} - c_{i(\text{real})})^2}{(c_{i(\text{real})} - c_{i(\text{med})})^2} \right] \quad [\text{I.17}]$$

$$\text{REP (\%)} = (100/c_{\text{med}}) \left(\sum_{i=1}^N (c_{i(\text{pred})} - c_{i(\text{real})})^2 \right) \quad [\text{I.18}]$$

I.5.3.2.A.2. Cifras de mérito

La calidad de una calibración puede evaluarse de una manera más completa mediante una serie de parámetros estadísticos conocidos como cifras de mérito.¹⁰⁶

Tabla I.5.5. Cifras de mérito de la calibración.

-
- LOD, definido según la Ecuación I.19, representa la mínima concentración del analito cuya señal, por convención, es tres veces la del ruido. Es el nivel más bajo de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse.
 - LOQ representa la mínima concentración del analito cuya señal es diez veces superior al ruido. Es el nivel más bajo de analito en la muestra, que puede ser determinado con precisión y exactitud determinadas y se define como en la Ecuación I.20, donde los términos $\|\mathbf{e}\|$, \mathbf{s}_k^* y \mathbf{s}_k tienen el mismo significado que para el cálculo de LOD.
 - SEL indica la capacidad del método para determinar el analito de interés en presencia de otros en una matriz compleja. Se calcula mediante la Ecuación I.21.
 - SEN está definida por la pendiente de la curva de calibración, por analogía con el caso de la calibración univariada. Se estima como se indica en la Ecuación I.22.
 - La sensibilidad analítica (γ): El contexto de la calibración multivariada se define como el cociente indicado en la Ecuación I.23.
 - La mínima diferencia de concentración detectable es la inversa de la sensibilidad analítica, (Ecuación I.24) e informa la mínima diferencia de concentración que puede apreciarse para el analito en estudio a lo largo del intervalo de calibración, para el método dado.
-

Las mismas comprenden el límite de detección (LOD), el límite de cuantificación (LOQ) y la selectividad (SEL), cuyas definiciones para casos generales ya han sido formuladas más arriba. La sensibilidad (SEN), la sensibilidad analítica (γ) y la mínima diferencia de concentración detectable constituyen parámetros de interés adicionales.

En técnicas de calibración multivariada, estos parámetros se obtienen empleando cálculos de señal neta del analito.⁹⁹ En el cálculo intervienen ϵ , el ruido instrumental, $\|\epsilon\|$, la norma Euclídeana ($\|\ \|$) del vector correspondiente a la medida del ruido instrumental y \mathbf{s}_k^* , la proyección del vector de sensibilidades espectrales del componente k puro (\mathbf{s}_k) sobre el espacio de la señal neta del analito. La Tabla I.5.5 consigna las definiciones de las cifras de mérito, cuyas fórmulas de cálculo se detallan en las Ecuaciones I.19-I.24, respectivamente.

$$\text{LOD}_k = 3 \frac{\|\epsilon\|}{\|\mathbf{s}_k^*\|} \quad [\text{I.19}]$$

$$\text{LOQ}_k = 10 \frac{\|\epsilon\|}{\|\mathbf{s}_k^*\|} \quad [\text{I.20}]$$

$$\text{SEL}_k = \frac{\|\mathbf{s}_k^*\|}{\|\mathbf{s}_k\|} \quad [\text{I.21}]$$

$$\text{SEN}_k = \|\mathbf{s}_k^*\| \quad [\text{I.22}]$$

$$\gamma_k = \frac{\text{SEN}_k}{\epsilon} \quad [\text{I.23}]$$

$$\text{MDC} = \gamma_k^1 \quad [\text{I.24}]$$

I.5.3.2.A.3. Muestras discordantes (Outliers)

La presencia de muestras discordantes o rechazables, puede deberse a diferentes razones, incluyendo errores instrumentales, errores de laboratorio, objetos de otra población, etc. Cuando las mismas se incluyen en la calibración, influyen de manera negativa en la calidad de la predicción. Por ello, la detección de este tipo de muestras es de gran relevancia; en algunos casos inclusive éstas pueden ser muy informativas, especialmente cuando tienen

lugar en la calibración, ya que pueden estar indicando sobre alguna variabilidad en los datos que el modelo no está controlando adecuadamente.

Construido un modelo apropiado, los valores de errores del vector de calibración (en espectroscopia, espectros residuales no explicados por el modelo) o de concentración ($c_{\text{pred}} - c_{\text{real}}$) pueden ser utilizados para descartar racionalmente datos discordantes. En el caso de vectores residuales, especialmente durante la calibración, suelen construirse indicadores matemáticos relacionando la norma del vector de información no explicada por el modelo con el promedio de dicha variable en el resto de los vectores. Superado un valor límite de dicho indicador, se considera que el error producido por el dato discordante es inaceptable, al punto que se habilita su remoción del conjunto.

1.5.3.2.A.4. Pre-procesamiento de datos en PLS

Las ventajas del pre-procesamiento de datos se han discutido previamente, en este Capítulo. El procedimiento de centrado en la media es el que se empleará durante este trabajo de Tesis. El mismo tiene la ventaja de hacer los datos menos dependientes de derivas de la línea de base y generalmente conduce a modelos que requieren menos LVs, lo que simplifica notablemente el esfuerzo de cálculo y confiere mayor robustez a los modelos de calibración.

1.5.3.2.A.5. Selección de variables

A pesar de que PLS es denominado un método “de espectro completo”, numerosos trabajos que se encuentran en la literatura han dado cuenta que a menudo resulta útil o necesario seleccionar las variables más apropiadas para la construcción de los modelos, ya que no todos los sensores (longitudes de onda en el caso de espectroscopia) contienen información de la misma calidad, o de calidad apropiada.

La selección del conjunto de longitudes de onda óptimas puede realizarse en base a

criterios espectroscópicos ayudados por técnicas quimiométricas, de 2ª derivada y PCA, entre otras. Existen distintos métodos para realizar una selección racional de los sensores a utilizar; entre ellos se encuentran la pre-selección de variables por variancia, el algoritmo de Eliminación de Variables Carentes de Información,¹⁰⁷ (en inglés, UVE-PLSS, *Uninformative Variable Elimination-PLS*), el método denominado EMCUVE (del inglés, *Ensemble of Monte Carlo Uninformative Variable Elimination*),¹⁰⁸ el cual combina técnicas de simulación de Monte Carlo con el algoritmo UVE y representa una alternativa superadora de este último; también se usa el método de Red de Interacción de Variables (en inglés, VIN, *Variable Interaction Network*),¹⁰⁹ que es un método gráfico reciente, basado en correlaciones parciales, y SIMPLISMA (del inglés, *Simple-to-use Interactive Self-Modeling Mixture Analysis*),¹¹⁰ que hace empleo de la función de pureza (en inglés, *purity function*) definida en el algoritmo, que permite trazar un mapa de las regiones de variables potencialmente influyentes.

Sin embargo, los dos métodos de selección de variables más utilizados son los algoritmos genéticos,¹¹¹ así como el algoritmo de la ventana móvil de ancho variable.¹¹² Durante este trabajo de Tesis se empleará este último ya que es el más apto para vectores señal con un número discreto de sensores, como es el caso de los resultantes de aplicar técnicas de espectroscopia (sobre todo en el UV) y otras como voltametría diferencial de pulso.

1.5.3.2.A.6. Diseños experimentales

El diseño experimental es una herramienta que permite extraer la mayor cantidad posible de información de un proceso o producto. En el caso de la química analítica y para la construcción de calibraciones, éste constituye un camino eficiente que permite alcanzar el objetivo con un mínimo de experimentos. Esto es especialmente importante en el ámbito de la calibración multivariada, donde el objetivo es determinar uno o más componentes

dependientes de varios factores en mezclas complejas de multicomponentes.¹¹³

En la construcción de diseños experimentales, se designa con el nombre de “factor” a las variables que pueden controlarse con el objeto de estudiar su efecto sobre el proceso o producto, y que tienen (o podrían tener) influencia sobre las características estudiadas. En los casos analíticos objeto de esta Tesis y en el contexto del diseño experimental, se denominarán factores a las concentraciones de los analitos a cuantificar.

Por otra parte, las características del proceso o producto a ser optimizado reciben el nombre de “respuestas”. Estas son, por lo tanto, variables que describen el funcionamiento del sistema. En la calibración multivariada, algunos de los objetivos importantes son la optimización de la calidad predictiva del modelo, como así también las cifras de mérito del sistema, a fin de lograr una mejor y más confiable predicción.

En este contexto, el diseño experimental tiene como propósito modelar óptimamente la relación entre las variables **X** e **Y** con un mínimo de experimentos diseñados racionalmente, donde **X** son variables controladas o factores, mientras que **Y** son las variables dependientes o respuestas.

El primer paso que debe darse para lograr un diseño experimental apropiado es definir los factores en juego y luego los distintos niveles a los que éstos se estudiarán, incluyendo sus extremos,¹¹⁴ es decir el dominio experimental. Este último deberá estar de acuerdo con los propósitos del estudio, no siendo necesario que los niveles sean del mismo tamaño; además, dichos niveles pueden tener su propio intervalo de variación.

Entre los diseños experimentales más empleados, se encuentran los consignados en la Tabla I.5.6. Por su relación con el desarrollo de este trabajo de Tesis, donde prevalecen las aplicaciones del diseño experimental con fines cuantitativos, se consideran el diseño factorial completo (en inglés, *full factorial*) y el diseño central compuesto (DCC).

El diseño factorial es una técnica introducida por Fisher en 1926,¹¹⁵ que proporciona el

medio por el cual los factores que pueden tener influencia sobre un proceso pueden ser evaluados simultáneamente, junto con su importancia relativa. La técnica puede ser aplicada a numerosos problemas farmacéuticos, siendo ésta la base racional de muchas pruebas que procuran encontrar una solución óptima.

Tabla I.5.6. Diseños experimentales de uso habitual en el control de calidad de productos farmacéuticos.

Diseños Experimentales Generales		Utilización
<ul style="list-style-type: none"> • Factoriales 	<ul style="list-style-type: none"> • Factorial completo 	Optimización / Cuantificación
	<ul style="list-style-type: none"> • Factorial Fraccionario 	Optimización / Exploración
	<ul style="list-style-type: none"> • Taguchi 	Exploración
	<ul style="list-style-type: none"> • Placket-Burman 	Exploración
	<ul style="list-style-type: none"> • D-óptimo 	Optimización / Exploración
<ul style="list-style-type: none"> • Central compuesto (DCC) 		Optimización / Cuantificación
<ul style="list-style-type: none"> • Doehlert 		Optimización / Cuantificación
<ul style="list-style-type: none"> • Box-Benhken 		Optimización / Cuantificación
<ul style="list-style-type: none"> • Asimétricos 		Optimización / Cuantificación

El número de experimentos diferentes (N) que deben realizarse en un dado diseño factorial está dado por la expresión de la Ecuación I.25, donde a es el número de niveles para cada una de los k factores. En este caso, todos los factores presentan el mismo número de niveles.

$$N = a^k \quad [I.25]$$

Según la Ecuación I.25, la cantidad de experimentos asciende considerablemente para pequeños incrementos de a o de k (Figura I.5.3), siendo la experimentación esencialmente

impracticable cuando a o k son mayores de 3. Sin embargo, el número de experimentos para la misma cantidad de factores puede reducirse considerablemente si en su lugar se utiliza un diseño alternativo, como por ejemplo un arreglo del tipo “central compuesto”.

El DCC es una progresión de los diseños factoriales que fue presentado por Box y Wilson en 1951,¹¹⁶ y ha sido extensamente usado en el modelado de superficies de respuesta y actividades de optimización. La Tabla I.5.7 contiene las características más destacadas de este diseño, ejemplificado con tres variables.

Tabla I.5.7. Características destacadas de un diseño experimental central compuesto.

-
1. Un diseño cúbico, que responde a un diseño factorial completo a dos niveles, donde el número de experimentos está dado por $N_c = a^k$.
 2. Un diseño estrella, el cual se lleva a cabo agregando más niveles, los que se sitúan a una distancia α del centro, describiendo una estrella. El número de puntos responde a los puntos axiales (N_s). El valor que toma α está dado generalmente por $\alpha = (N_c)^{1/4}$. Cuando los puntos de la estrella “sobresalen” del diseño cúbico, éste se denomina circunscripto. La estrella aporta 6 puntos más al conjunto experimental de la Figura I.5.3.b.
 3. Un punto central (N_0) con los niveles de todos los factores iguales al valor central, del que generalmente se preparan replicados por lo general no menos de 3, lo que permite obtener una idea de la variabilidad del proceso.
-

En el caso de 3 factores y tres niveles, si el punto central es un único replicado, el número total de experimentos a realizar empleando este diseño es $N_{total} = N_c + N_s + N_0 = 8 + 6 + 1 = 15$; este resultado indica el requerimiento de un número de muestras menor que $N_{total} = a^k = 3^3 = 27$, las que habrían sido necesarias si se hubiera aplicado un diseño factorial completo de 3 factores a tres niveles. Por otra parte, el DCC detallado permite evaluar cinco niveles para cada una de las tres variables consideradas.

I.5.3.2.B. Método de regresión sobre componentes principales (PCR)

La Regresión sobre Componentes Principales (PCR), antecesor inmediato del PLS, aprovecha las propiedades de la descomposición en componentes principales (PCA), realizando una regresión múltiple inversa de la propiedad a determinar sobre los tantos obtenidos en el PCA en lugar de realizarla sobre los datos originales, en un proceso que transcurre virtualmente sin pérdida de información analítica útil.

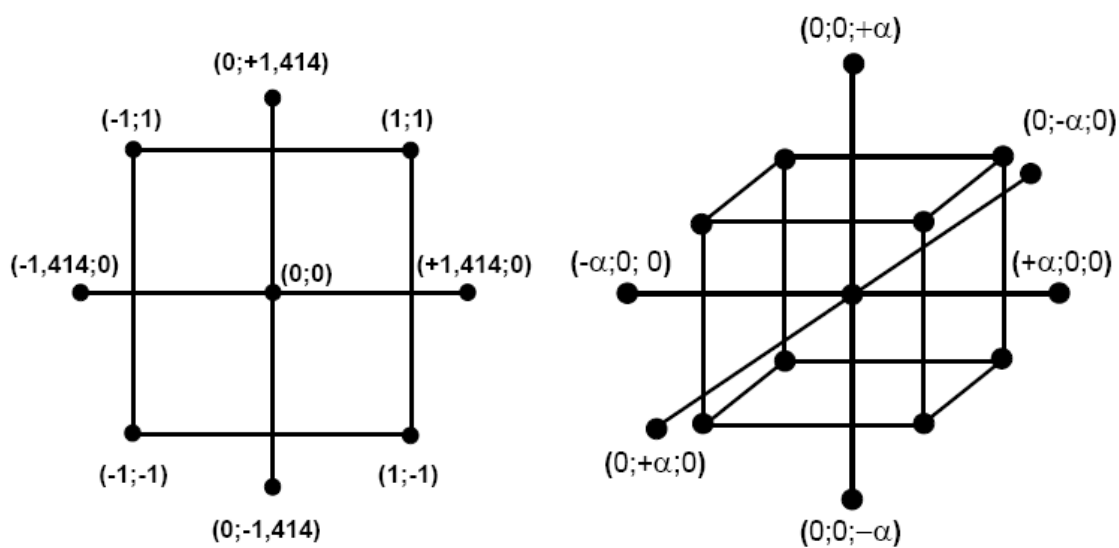


Figura I.5.3. a. Diseño central compuesto circunscrito para dos factores. b. Diseño central compuesto circunscrito para tres factores.

Dada una muestra con un conjunto de m especies, se tienen m variables $c_1, c_2, c_3 \dots c_m$ que representan la concentración de cada componente y que pueden ser escritas bajo la forma del vector \mathbf{c} . El espectro de la misma, registrado a k longitudes de onda constituye un conjunto de k variables independientes $a_1, a_2, a_3 \dots a_k$, que pueden ser escritas en forma del vector \mathbf{a} .

Si se construye un conjunto de calibración con N objetos, los vectores que describen cada uno de ellos se pueden agrupar en dos matrices: la matriz \mathbf{C} de dimensiones $(n \times m)$, que contiene las concentraciones de cada componente en cada muestra y la matriz \mathbf{A} , que contiene los espectros de cada muestra, de dimensiones $(n \times k)$. 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. El primer paso del PCR consiste en realizar una descomposición de la matriz \mathbf{A} en sus componentes principales, de la forma indicada en la ecuación I.26.

$$\mathbf{A} = \mathbf{t}_1\mathbf{v}_1' + \mathbf{t}_2\mathbf{v}_2' + \dots + \mathbf{t}_a\mathbf{v}_a' + \mathbf{E} \quad [\text{I.26}]$$

Una vez elegido el número a de componentes principales que se considere como óptimo para describir la matriz \mathbf{A} , lo cual se realiza con una metodología similar a la descrita para el caso de PLS, ésta se puede representar por su matriz de tantos \mathbf{T} .

$$\mathbf{A} = \mathbf{T} \mathbf{V}' + \mathbf{E} \quad [\text{I.27}]$$

A continuación, con la matriz de datos \mathbf{C} se puede plantear la ecuación I.28.

$$\mathbf{C} = \mathbf{T} \mathbf{B} + \mathbf{E} \quad [\text{I.28}]$$

donde $\hat{\mathbf{B}}$ (el símbolo $\hat{}$ indica valores calculados) es la matriz de regresores que se puede hallar por el método de mínimos cuadrados, conociendo los valores de concentración del conjunto de calibración, según la Ecuación I.29.

$$\hat{\mathbf{B}} = (\mathbf{T}' \mathbf{T})^{-1} \mathbf{T}' \mathbf{C} \quad [\text{I.29}]$$

Una vez calculados los regresores, y por lo tanto establecido el modelo de calibración, se pueden realizar los cálculos para predecir un conjunto de nuevas muestras. En primer lugar,

la matriz de datos analíticos del conjunto de muestras de predicción \mathbf{A}^* , se centra o auto-escala utilizando los valores calculados a partir de la matriz de datos \mathbf{A} empleada en la calibración. A partir de la matriz de cargas \mathbf{V} calculada en la calibración, para el número a de componentes principales óptimos, se calculan los tantos de las muestras de predicción, \mathbf{T}^* , según la Ecuación I.30.

$$\mathbf{T}^{*'} = \mathbf{A}^* (\mathbf{V}' \mathbf{V}) / \mathbf{V}' \quad [\text{I.30}]$$

Luego se utiliza la matriz de regresores calculada previamente durante la calibración, junto con los tantos de estas muestras, para el cálculo de la propiedad a determinar en las muestras desconocidas, según la Ecuación I.31.

$$\hat{\mathbf{C}} = \mathbf{T}^* \mathbf{B} \quad [\text{I.31}]$$

Uno de los principales problemas de PCR es que los componentes principales que mejor representan la matriz de los datos con la señal analítica \mathbf{A} , pueden no ser los más apropiados para la predicción de las propiedades de los analitos que se desea determinar, motivo por el cual PLS se presenta como un método superior. La validación interna y optimización para un modelo PCR, como el cálculo de cifras de mérito y el pre-procesamiento de los datos se llevan a cabo por procedimientos similares a los detallados para PLS.

I.6. PRODUCTOS DE INTERÉS FARMACÉUTICO OBJETOS DE ESTUDIO

I.6.1. Acetaminofeno y Diclofenaco

La asociación farmacológica entre los DAINES Diclofenaco (DIC) y Acetaminofeno (ACE), cuyas estructuras se muestran en la Figura I.6.1, se comercializa en una relación de

masas 1:6.¹¹⁷ Esta combinación está indicada para situaciones terapéuticas especiales como artritis reumatoide, osteoartritis y espondilitis anquilosante. Ambos principios activos pertenecen al mismo grupo farmacológico, siendo inhibidores de las prostaglandina ciclooxigenasas I y II (COX-I y COX-II, respectivamente), enzimas que intervienen en la formación de prostaglandinas, mediadores de los procesos inflamatorios.

En DIC predomina la acción anti-inflamatoria, mientras que ACE es útil por sus efectos analgésicos y antipiréticos. La diferencia de efectos se basa principalmente en sus sitios de acción, ya que ACE no puede actuar en los sitios donde se desarrolla el proceso inflamatorio por ser altamente sensible a los radicales libres, abundantes en los procesos inflamatorios.



Figura I.6.1. Estructuras químicas de Acetaminofeno y Diclofenaco.

I.6.2. Clorhidrato de Pseudoefedrina y Clorhidrato de Fexofenadina

La asociación medicamentosa entre Clorhidrato de Fexofenadina (FEX) y Clorhidrato de Pseudoefedrina (PEF), es utilizada para tratar casos de alergia y resfríos con amplia congestión nasal (Figura I.6.2).

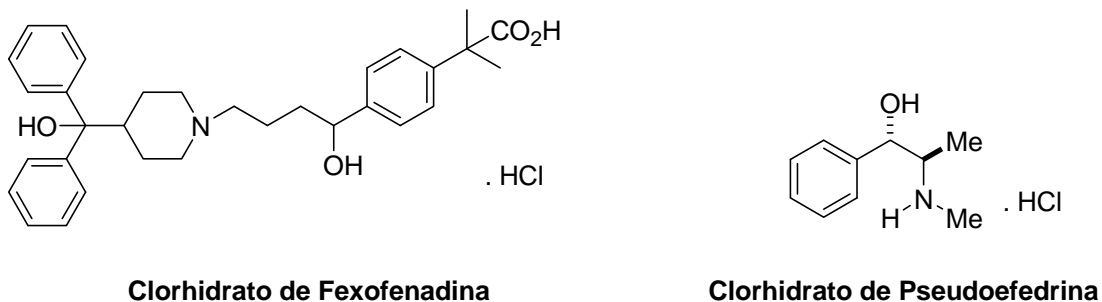


Figura I.6.2. Estructuras químicas de Clorhidrato de Fexofenadina y Clorhidrato de Pseudoefedrina.

FEX es un antihistamínico de segunda generación, mientras que PEF presenta acción descongestiva. El producto se comercializa formulado en relación de masas 1:2, respectivamente.¹¹⁸ Esta mezcla de principios activos no está codificada oficialmente y por ello no se cuenta con métodos oficiales para su control.

I.6.3. Hidroclorotiazida y Losartán Potásico

El Losartán Potásico (LST) es un antagonista no-peptídico de los receptores de Angiotensina II, que actúa principalmente bloqueando los receptores de angiotensina AT1, con la consecuente reducción del efecto vasopresor de la Angiotensina II. LST presenta menores efectos adversos que los fármacos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina.¹¹⁹

Por su parte, Hidroclorotiazida (HCT) es un principio activo que pertenece a la clase de diuréticos tiazídicos; éstos actúan sobre los riñones para reducir la reabsorción de sodio en el túbulo distal, aumentando la osmolaridad en el lumen y haciendo que menos agua sea reabsorbida por los conductos.

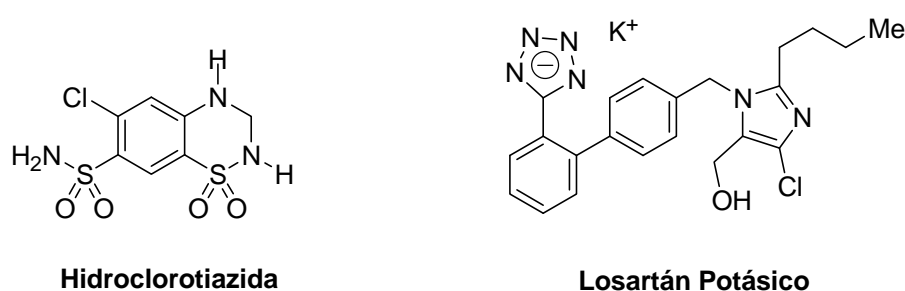


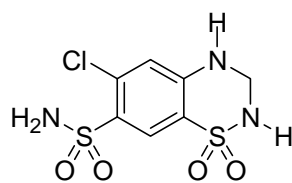
Figura I.6.3. Estructuras químicas de Hidroclorotiazida y Losartán Potásico.

La combinación de LST con HCT (Figura I.6.3), en relación de masas (4:1), da lugar a una asociación muy empleada en la terapia antihipertensiva moderna por su elevada efectividad.¹²⁰

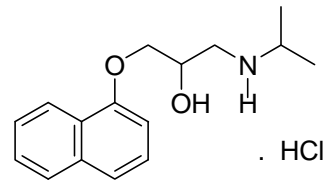
I.6.4. Hidroclorotiazida y Clorhidrato de Propranolol

Esta asociación de un diurético tiazídico como Hidroclorotiazida (HCT), cuya acción ha sido discutida en el apartado anterior, con un antagonista β -adrenérgico no selectivo como el Clorhidrato de Propranolol (PRO) es una combinación farmacológica¹²¹ muy utilizada en el tratamiento de la hipertensión arterial (Figura I.6.4),¹²² por ser una alternativa válida para personas que no toleran los inhibidores de la enzima convertidora de la Angiotensina.¹²³

Esta combinación farmacológica se encuentra disponible para ser administrada en dos relaciones de masas diferentes a) 40 mg de PRO y 25 mg de HCT y b) 80 mg de PRO y 25 mg de HCT, según la necesidad del paciente.



Hidroclorotiazida

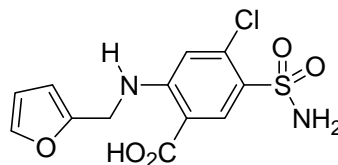


Clorhidrato de Propranolol

Figura I.6.4. Estructuras químicas de HCT a la izquierda y PRO a la derecha.

I.6.5. Furosemida

Furosemida (FUR) es un diurético ampliamente utilizado en la clínica (Figura I.6.5), perteneciente al grupo de los diuréticos del asa.



Furosemida

Figura I.6.5. Estructura química de Furosemida.

Este principio activo es usado en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva y del edema relacionado con la misma; también tiene utilidad como reactivo de diagnóstico para evaluar el efecto terapéutico de un principio activo sobre la insuficiencia renal.¹²¹ Ocasionalmente, puede ser usado en el manejo de la hipercalcemia severa, en combinación con una hidratación adecuada (<http://www.amh.net.au>).¹²⁴

Furosemida presenta polimorfismo cristalino, que incluye un estado amorfo y tres formas cristalinas (P-I, P-II y P-III), habiéndosele descrito además sendos solvatos de dimetilformamida y dioxano.¹²⁵

La presencia de una dada forma polimórfica dicta la solubilidad del producto; puesto que FUR presenta baja solubilidad en agua, diferencias en la composición polimórfica del producto presentarán influencia en la tasa de su absorción en el cuerpo humano y por ello en la biodisponibilidad del principio activo. Esta es una de las razones por las que los productos formulados sólidos de uso oral conteniendo este principio activo son considerados “de riesgo sanitario”.

La determinación del riesgo sanitario se basa en dos aspectos; en primer término el terapéutico, que se refiere a los principios activos utilizados en desórdenes serios, ya sea porque ponen en peligro la vida del paciente o porque pueden inducir complicaciones graves en su cuadro, y en segundo término el de seguridad, que evalúa el riesgo derivado de la administración de principios activos que poseen una estrecha relación entre su concentración máxima efectiva no tóxica y su concentración mínima efectiva. En el caso particular de FUR, que según ANMAT presenta riesgo sanitario “bajo”,^{15a} ello implica la existencia de una cierta probabilidad de aparición de una complicación menor de la enfermedad y/o de reacciones adversas leves cuando la concentración sanguínea del principio activo no se encuentra dentro de la ventana terapéutica. Pero este riesgo no puede ser despreciado si se considera que, de no alcanzarse la concentración de FUR en plasma suficiente para que efectúe su acción

terapéutica por falla de liberación, se estaría dejando a un paciente hipertenso sin tratamiento.

1.6.5.1. Polimorfismo cristalino

Un material cristalino es aquél donde sus moléculas constituyentes son parte de una estructura ordenada tridimensional. A menudo, las moléculas se arreglan en varias formas (redes cristalinas) dependiendo de las condiciones particulares de cristalización. Este tipo de material cristalino, se denomina polimorfo y habitualmente se llama de igual manera a cada uno de sus ordenamientos, como así también a la forma amorfa. Sin embargo, aún existe un amplio debate sobre lo que debería ser designado como polimorfismo;¹²⁶ de hecho, algunos fenómenos relacionados, por ejemplo la tautomería, también han sido denominados polimorfismo por ciertos autores. Las propiedades diferenciales observadas como consecuencia de la recristalización de un compuesto pueden deberse tanto a la solvatación (pseudopolimorfismo) como al polimorfismo verdadero. Los métodos de exploración usados para estudiar estas manifestaciones son idénticos en ambos casos y por ello, la distinción entre un solvato y un polimorfo no siempre está marcada nítidamente en la práctica.

El polimorfismo ha recibido intensa y constante atención académica e industrial desde los primeros informes del grupo de Aguiar, del Laboratorio Parke-Davis al respecto, en los cuales destacaron los efectos de polimorfismo sobre la disolución y biodisponibilidad del palmitato de cloranfenicol.¹²⁷ El polimorfismo ha sido el sujeto de varios cientos de publicaciones y numerosas revisiones, pero aún hasta la actualidad son desconocidos la totalidad de los efectos de polimorfismo sobre la estabilidad física, química y de manufactura, como así de la absorción oral de los principios activos de interés farmacéutico.

En esencia, la importancia del polimorfismo en la industria farmacéutica radica en el efecto de las propiedades diferenciales como solubilidad, porcentaje de disolución, reactividad química, punto de fusión, resistencia a la degradación, biodisponibilidad, etc., de

los polimorfos, que muchas veces son causa de diferente eficacia terapéutica.

Por lo general, sólo uno de los polimorfos es estable a una temperatura dada, mientras que los demás son meta-estables, tendiendo a desarrollar la fase estable con el transcurso del tiempo. Distintas autoridades regulatorias han establecido la necesidad de controlar el polimorfo utilizado como principio activo para asegurar su integridad durante las etapas de preparación y almacenamiento.

I.6.6. Aceite de Oliva

El aceite de oliva virgen (VOO) es uno de los aceites de cocina más utilizados en países del Mediterráneo y es un componente central de la dieta de esta área.¹²⁸ También es ampliamente utilizado como excipiente en formas farmacéuticas útiles por diversas vías, incluyendo orales, tópicas e inyectables (<http://www.vademecum.es/medicamento/farmacologia/A/338/1/6/1/lista-de-excipientes>; <http://ar.geocities.com/pescenet/pomadas.htm>).¹⁰ El aceite de oliva se encuentra codificado en la mayoría de las farmacopeas reconocidas internacionalmente.^{60,129}

I.6.6.1. Ácidos grasos e índice de peróxidos

Una de las características más importantes de los aceites de oliva es la presencia de un alto contenido de ácido oleico (Figura I.6.6), que representa alrededor del 60-80% de los ácidos grasos totales (TFA) y de aproximadamente el 90% de los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) del aceite¹³⁰ y un bajo contenido de los ácidos grasos saturados (SFA), siendo el ácido palmítico el principal exponente de estos últimos (Figura I.6.7).

Por su parte, los ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) contenidos en el aceite, que incluyen los ácidos linoleico y linolénico y que representan el 5-8% de la fracción de TFA, son nutricionalmente beneficiosos,¹³¹ al igual que los MUFA. El aceite de oliva virgen es

actualmente comercializado en EEUU como alimento con propiedades cardioprotectoras (<http://www.consumaseguridad.com/2004/11/03/15094.php>).

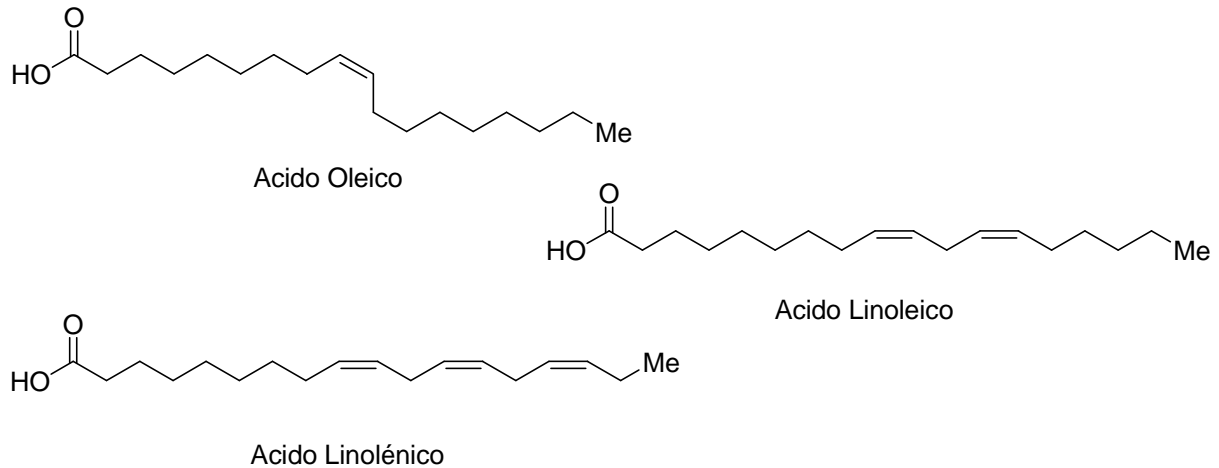


Figura I.6.6. Estructuras químicas de los ácidos grasos oleico, linoleico y linolénico.

Durante el almacenamiento y la cocción, los triglicéridos pueden sufrir una serie de reacciones químicas que incluyen hidrólisis, oxidación, isomerización y polimerización y a su vez, los productos de hidrólisis de MUFA y PUFA pueden sufrir reacciones oxidativas que conducen a la generación de peróxidos, aldehídos y cetonas, con la consecuente disminución de la calidad total del producto.

La oxidación de los aceites es un fenómeno muy complejo que implica principalmente a los ácidos grasos insaturados y modifica las características sensoriales del mismo a través del desarrollo de apagamiento de ciertos sabores y la aparición de algunos productos secundarios.¹³² Consecuentemente el control de este proceso toma gran importancia para preservar los atributos positivos del VOO en el periodo comprendido entre la producción, el embotellamiento y la venta del mismo. Existen distintos métodos analíticos propuestos para la evaluación de la degradación oxidativa del VOO, entre ellos el más aceptado es la determinación del índice de peróxidos, el cual determina la cantidad de productos primarios de oxidación, a través de una volumetría redox. De acuerdo con la Comisión Europea y el

Consejo Internacional del Aceite de Oliva, el límite de PV en VOO se define como $PV \leq 20$ meqO₂ Kg⁻¹.¹³³

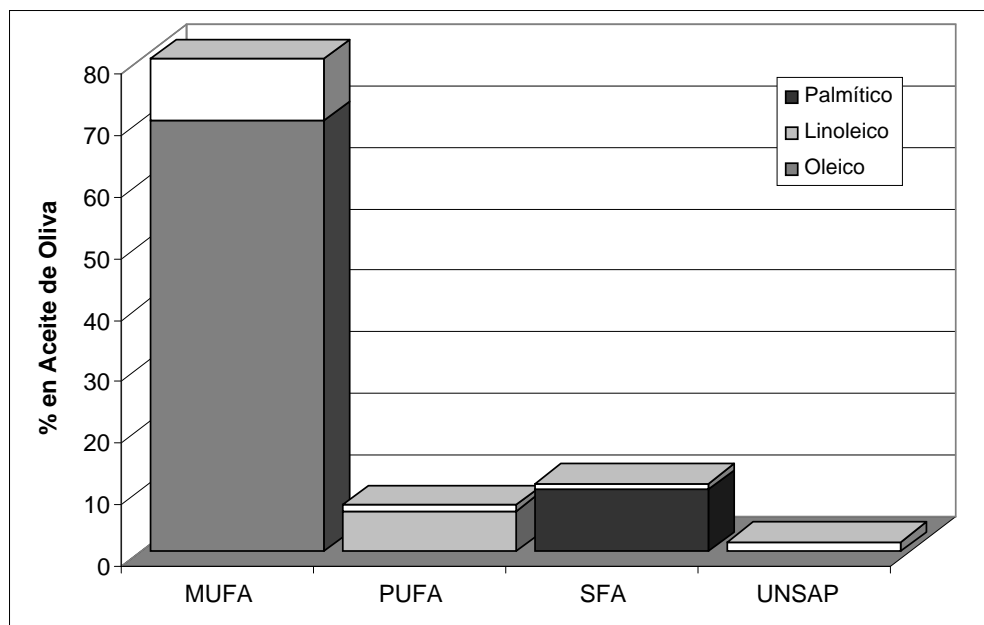


Figura I.6.7. Composición relativa de la fracción apolar del Aceite de Oliva, en términos de MUFA, PUFA, SFA y fracción insaponificable (UNSAP).

1.6.6.2. Compuestos antioxidantes

Una de las características de los aceites de oliva es la presencia en su composición de un alto contenido de compuestos antioxidantes como α -tocoferol, tirosol, hidroxitirosol y oleuropeina (Figura I.6.8), los cuales son responsables de muchas de sus cualidades alimenticias y de su particular sabor.

Los tocoferoles, comúnmente agrupados bajo el nombre de Vitamina E, se encuentran entre los principales antioxidantes fenólicos naturales en aceites vegetales y son responsables de muchas de las propiedades de estos productos. Ellos son eficaces extintores de radicales, protegiendo a los PUFA de su ataque.¹³⁴

La Vitamina E juega un papel importante en el nivel intracelular, ya que su deficiencia aumenta la fragilidad de la membrana y facilita el daño de las membranas causado por el

ozono, una de las especies reactivas oxigenadas, u otros radicales libres.¹³⁵ Dentro de este grupo, α -tocoferol es el de mayor proporción en el aceite de oliva.

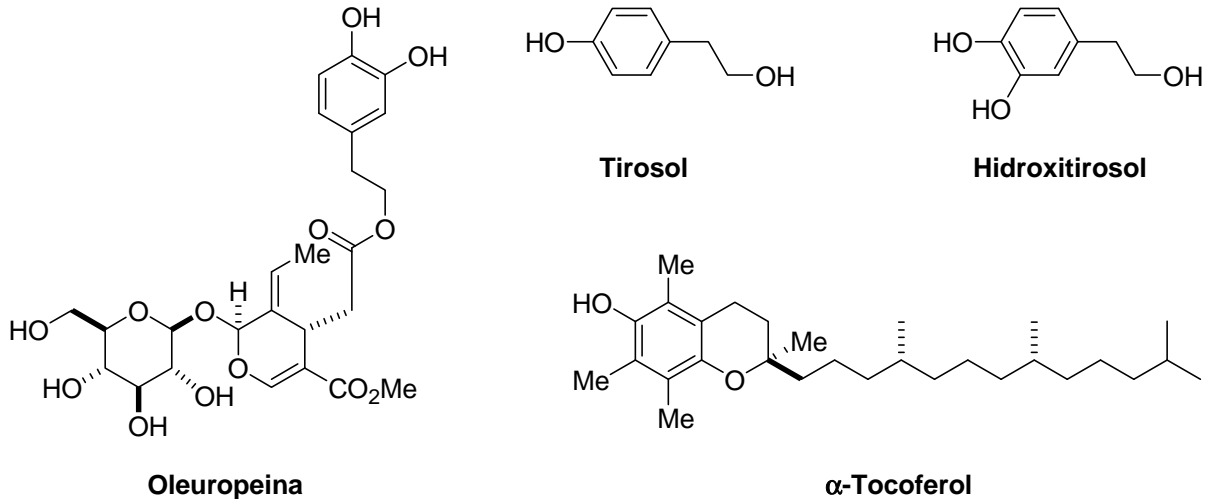


Figura 1.6.8. Estructuras químicas de compuestos antioxidantes del aceite de oliva extra-virgen, incluyendo α -tocoferol, tirosol, hidroxitirosol y oleuropeina.

El tirosol (TSL) es un antioxidante fenólico derivado del 2-feniletanol, que está presente en una gran variedad de productos naturales, siendo el aceite de oliva una de sus principales fuentes en la dieta humana. El tirosol puede proteger de los efectos de la oxidación a nivel celular.¹³⁶ Aunque no es tan potente como otros antioxidantes presentes en el aceite de oliva, su comparativamente elevada concentración con respecto a los otros antioxidantes y su buena biodisponibilidad sugieren que globalmente puede tener un importante rol de protección.¹³⁷ Este efecto puede contribuir considerablemente a los beneficios del aceite de oliva sobre la salud.

Hidroxitirosol (HTSL) también es un fitoquímico con propiedades antioxidantes, siendo uno de los más poderosos compuestos en su tipo presentes en el aceite de oliva. En la naturaleza, HTSL se encuentra en el aceite de oliva bajo la forma de su éster del ácido elenólico, la oleuropeina. También se encuentra libre, sobre todo después de la degradación. Las aceitunas, las hojas del olivo y la pulpa olivácea contienen pequeñas cantidades de HTSL,

la mayor parte del cual puede ser recuperado para producir extractos. Tanto TSL como HTSL y oleuropeina, son responsables del gusto amargo del VOO.

El contenido de compuestos fenólicos es un parámetro importante para la evaluación de la calidad de VOO, ya que los fenoles en gran parte contribuyen al olor y al gusto del mismo,¹³⁸ mientras que lo protegen de la auto-oxidación.¹³⁹

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO II:

MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. MATERIALES PARA EL DESARROLLO DE LOS MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS CUANTITATIVOS EN EL UV

II.1.1. Principios Activos Puros y Especialidades Farmacéuticas Comerciales Utilizados

II.1.1.1. Principios activos utilizados

Todos los principios activos puros utilizados en el desarrollo de este trabajo fueron de grado farmacopeico y se conservaron en un desecador, protegidos de la luz, durante el desarrollo de los experimentos.

- **Acetaminofeno:** Fue provisto por el Laboratorio de Especialidades Medicinales (LEM) de la Municipalidad de la Ciudad de Rosario. Calidad USP.⁶⁰
- **Clorhidrato de Fexofenadina:** Fue provisto por la Farm. Daniela Casas, de Laboratorios Lazar (Argentina). Calidad USP.⁶⁰
- **Clorhidrato de Propranolol:** Fue provisto por la Dra. Guillermina Volonté del Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos de la UNLP (La Plata, Argentina) y por la Dra. Sara Palacios, del CEPROCOR (Córdoba, Argentina). Calidad USP.⁶⁰
- **Clorhidrato de Pseudoefedrina** Fue provisto por la Farm. Daniela Casas, de Laboratorios Lazar (Argentina). Calidad USP.⁶⁰
- **Diclofenaco:** Fue una donación del Dr. Claudio J. Salomon, Departamento Farmacia, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la UNR. Calidad USP.⁶⁰
- **Furosemida:** Fue adquirida en Droguería PREST S.A. Calidad USP.⁶⁰ Fue caracterizada por espectroscopia en el infrarrojo, difracción de rayos X, calorimetría diferencial de

barrido y termogravimetría.

- **Hidroclorotiazida:** Marca SOCRAM. Calidad USP.⁶⁰ Se secó en estufa a 105°C durante 3 horas antes de ser utilizada.
- **Losartán Potásico:** Fue provisto por el Dr. Enrique L. Larghi, de Laboratorios Gador (Buenos Aires, Argentina). Calidad USP.⁶⁰

II.1.1.2. Especialidades farmacéuticas comerciales utilizadas

Los comprimidos comerciales empleados fueron adquiridos en Farmacias locales o recibidos en carácter de donación. Para el análisis de los componentes activos en formulaciones comerciales, se estudiaron las marcas disponibles en el mercado nacional que se detallan a continuación.

- **Paracetamol Forte Raffo[®]** de Laboratorio Raffo. Según el rótulo, cada comprimido contiene: Acetaminofeno 500 mg, Diclofenaco Potásico 50 mg y excipientes en c.s.
- **Oxagesic[®]** de Laboratorio Beta. Según el rótulo, cada comprimido contiene: Acetaminofeno 300 mg, Diclofenaco Potásico 50 mg y excipientes en c.s.
- **Dioxaflex Gesic[®]** de Laboratorio Bagó. Según el rótulo, cada comprimido contiene: Acetaminofeno 300 mg, Diclofenaco Potásico 50 mg y como excipientes Anhídrido Silícico Coloidal, Croscarmelosa Sódica, Povidona, Estearato de Magnesio, Opadry II y Almidón de Maíz, en c.s.
- **Allegra[®] D** de Laboratorio Sanofi-Aventis. Según el rótulo, cada comprimido contiene: Clorhidrato de Fexofenadina 60 mg, Clorhidrato de Pseudoefedrina 120 mg y como excipientes Ácido Estéarico, Almidón Pregelatinizado, Celulosa Microcristalina, Cera de Carnauba, Croscarmelosa Sódica, Dióxido de Silicio Coloidal, Estearato de Magnesio, Hidroxipropilmetilcelulosa y Polietilenglicol (Opadry YS-1-7006), en c.s.

- **Propayerst[®] Plus 40 mg / 25 mg** de Laboratorio Wyeth. Según el rótulo, cada comprimido contiene: Clorhidrato de Propranolol 40 mg, Hidroclorotiazida 25 mg y como excipientes Lactosa 78,2 mg, Celulosa Microcristalina 63 mg, Ácido Esteárico 3,13 mg, Estearato de Magnesio 0,63 mg y Óxido de Hierro Amarillo 0,042 mg.
- **Propayerst[®] Plus 80 mg / 25 mg** de laboratorio Wyeth. Según el rótulo, cada comprimido contiene: Corhidrato de Propranolol 80 mg, Hidroclorotiazida 25 mg y como excipientes Lactosa 145 mg, Celulosa Microcristalina 64 mg, Ácido Estearico 4,8 mg, Estearato de Magnesio 1 mg y Óxido de Hierro Amarillo 0,064 mg.
- **Cozaarex[®] D** de Laboratorio Merk Sharp & Dhome. Según el rótulo, cada comprimido contiene: Losartán Potásico 50 mg, Hidroclorotiazida 12,5 mg y como excipientes Celulosa Microcristalina, Almidón Pregelatinizado 1500, Estearato de Magnesio, Hidroxipropilcelulosa, Dióxido de Titanio, Amarillo de Quinolina-Laca Aluminica y Cera de Carnauba, en c.s.
- **Furosemida Fecofar** de Laboratorios Fecofar. Según el rótulo, cada comprimido contiene: Furosemida 40 mg y como excipientes Ludipress 210 mg y Estearato de Magnesio 5 mg.
- **Lasix[®]** de Laboratorio Aventis. Según el rótulo, cada comprimido contiene: Furosemida 40 mg y como excipientes Almidón de Maíz Pregelatinizado 56,88 mg, Estearato de Magnesio 0,32 mg, Lactosa 53,00 mg, Sílice Coloidal Anhidra 0,40 mg y Talco 2,40 mg.
- **Errolón[®]** de Laboratorio Sandoz. Según el rótulo, cada comprimido contiene: Furosemida 40 mg y como excipientes, Lactosa, Almidón de Maíz, Acdisol, Gelatina y Estearato de Magnesio, en c.s.
- **Mejoral[®]** de Laboratorio Elisium. Según el rótulo, cada comprimido contiene: Acetaminofeno CD 90% 556 mg (equivalente a 500 mg de Acetaminofeno) y excipientes en c.s.

- **Tafiro[®]** de Laboratorio Sidus. Según el rótulo, cada comprimido contiene: 500 mg de Acetaminofeno y como excipientes Povidona, Dióxido de Silicio Coloidal, Celulosa Microcristalina PH 200, Croscarmelosa Sódica y Estearato de Magnesio, en c.s.
- **Paracetamol Raffo[®]** de Laboratorio Raffo. Según el rótulo, cada comprimido contiene: Acetaminofeno DC 90% 556 mg (equivalente a 500 mg de Acetaminofeno) y excipientes en c.s.

II.1.2. Reactivos, Soluciones Madre, Diluciones y Soluciones de Trabajo

A continuación se describe la preparación de las soluciones madre de los principios activos utilizados, las que se conservaron a 4°C y al abrigo de la luz, y los diferentes grupos de muestras de trabajo (calibración, validación, estabilidad y “muestras sintéticas”) cuyas concentraciones se indican en los apartados correspondientes. Además, se describe la preparación de las soluciones a partir de las especialidades farmacéuticas comerciales a ser analizadas por los distintos métodos desarrollados.

El agua utilizada como disolvente fue doblemente destilada. El metanol utilizado fue marca Anedra calidad PA. El mismo se utilizó tal como fue recibido o fue sometido a bi-destilación, según la necesidad, controlando en cada caso su espectro de absorción en el ultravioleta. Los restantes reactivos empleados fueron de grado PA.

Para los análisis de CLAE se emplearon solventes orgánicos (MeOH, ACN) de grado CLAE. Todos los solventes fueron desgasificados y filtrados a través de una membrana de nylon marca Millipore de 0,45 µm de tamaño de poro antes de ser usados.

II.1.2.1. Soluciones de Diclofenaco Sódico y Acetaminofeno

II.1.2.1.A. Soluciones para PLS

Las soluciones madre de ACE y de DIC se prepararon por pesada exacta y dilución de

los principios activos en MeOH, siendo sus concentraciones finales de $2,05 \text{ g L}^{-1}$ y $0,40 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente.

Las mezclas sintéticas binarias de calibración se prepararon por dilución de las correspondientes soluciones madre, llevada a cabo en matraces de 25 mL con HCl 10^{-4} M , siendo las concentraciones finales de ACE $19,97 - 29,95 \text{ mg L}^{-1}$ y de DIC $2,94 - 4,42 \text{ mg L}^{-1}$. Las mezclas presentaron variaciones en la relación de concentraciones de los componentes dentro de estos intervalos.

Tres conjuntos de seis mezclas sintéticas de validación se prepararon por dilución apropiada de las soluciones madre, llevada a cabo en matraces de 25 mL con HCl 10^{-4} M , encontrándose las concentraciones finales entre $21,46 - 28,95 \text{ mg L}^{-1}$ y $3,16 - 4,27 \text{ mg L}^{-1}$, para ACE y DIC respectivamente.

Para el análisis de los componentes activos en las especialidades farmacéuticas comerciales se estudiaron tres marcas disponibles en farmacias locales (Paracetamol Forte Raffo[®], Oxagesic[®] y Dioxaflex Gesic[®]). En cada caso, se pesaron 20 comprimidos determinándose su peso promedio; los mismos se pulverizaron en mortero y se mezclaron convenientemente hasta homogeneidad. Porciones de polvo de entre 40 y 60 mg según el peso promedio de los comprimidos de cada marca, equivalentes a aproximadamente 22,4 mg de ACE y 3,7 mg de DIC fueron exactamente pesados y transferidos a matraces aforados de 25 mL a los cuales se les adicionó 12,5 mL de HCl 10^{-4} M . Los matraces se agitaron por 30 min, se llevaron a volumen con el mismo solvente y se los dejó decantar por 30 min. Luego, 1 mL exactamente medido de cada una de estas soluciones se transfirió a sendos matraces aforados de 25 mL y se enrasó con una solución de HCl 10^{-4} M .

II.1.2.1.B. Soluciones para CLAE

La curva de calibración para DIC fue realizada por duplicado para una serie de

soluciones en el intervalo de concentraciones de 0,46 – 0,84 mg mL⁻¹, preparadas por diluciones apropiadas de la solución madre (ítem II.1.2.1.1) en matraces aforados de 25 mL utilizando una mezcla MeOH-H₂O (70:30, v/v) como diluyente.

Para ACE, la curva de calibración fue llevada a cabo de manera análoga a la anterior, en un intervalo de concentraciones de 0,05 – 0,15 mg mL⁻¹, utilizando como solvente una mezcla MeOH-H₂O (3:1, v/v).

Para la determinación de DIC en las formulaciones comerciales, se tomaron alícuotas de polvo exactamente pesadas de unos 380 mg (equivalente a aproximadamente 31 mg de DIC) que fueron transferidas a sendos matraces aforados de 50 mL. El polvo se disolvió en 25 mL de MeOH-H₂O (70:30, v/v) mediante agitación y la mezcla fue llevada a volumen con el mismo solvente.

Para la determinación de ACE, porciones pulverizadas de los comprimidos de alrededor de 30 mg exactamente pesados (equivalentes a unos 16 mg de ACE) fueron transferidas a sendos matraces aforados de 10 mL, mezcladas con 5 mL de MeOH-H₂O (1:3, v/v) y llevadas a volumen con el mismo solvente. Alícuotas de 300 µl fueron transferidas a matraces de 5 mL, que se llevaron a volumen con el mismo solvente.

II.1.2.2. Soluciones de Clorhidrato de Pseudoefedrina y Clorhidrato de Fexofenadina

II.1.2.2.A. Soluciones para PLS

Las soluciones madre de FEX y de PEF se prepararon por pesada exacta y dilución de los principios activos en una mezcla de HCl 0,1 M y MeOH (80:20, v/v) en matraces aforados de 100 mL, siendo sus concentraciones finales de 1,106 g L⁻¹ y 1,098 g L⁻¹, respectivamente.

El conjunto de 16 mezclas de calibración se preparó por dilución de las soluciones madre, que se llevó a cabo en matraces aforados de 25 mL con HCl 0,1 M-MeOH (80:20, v/v) encontrándose las concentraciones finales de FEX y PEF en los intervalos 177 – 332 mg L⁻¹ y

351 – 659 mg L⁻¹, respectivamente, siendo variable la relación de concentraciones de ambos componentes en las mezclas.

Cuatro conjuntos de nueve mezclas sintéticas de validación se prepararon por dilución, que fue llevada a cabo en matraces de 25 mL con una solución de HCl 0,1 M-MeOH (80:20, v/v), encontrándose las concentraciones finales de los analitos entre 21,46 – 28,95 mg L⁻¹ y 3,16 – 4,27 mg L⁻¹, para FEX y PEF respectivamente.

Para el análisis de los componentes activos en formulaciones comerciales se estudió una marca disponible en Farmacias locales (Allegra[®] D). Para ello, se pesaron 20 comprimidos determinándose su peso promedio; los mismos se pulverizaron en un mortero y se mezclaron convenientemente hasta homogeneidad. Porciones de polvo representativas del peso de un comprimido (780 – 820 mg), equivalentes a aproximadamente 60 mg de FEX y 120 mg de PEF fueron exactamente pesadas y transferidas a sendos matraces aforados de 50 mL a los cuales se les adicionó 12,5 mL de MeOH. Los matraces se agitaron por 30 min, luego se llevaron a volumen con HCl 0,1 M y se los dejó decantar por 30 min. A continuación, 2 mL exactamente medidos de cada una de estas soluciones se transfirieron a sendos matraces aforados de 10 mL y se enrasó con una mezcla de HCl 0,1 M y MeOH (80:20, v/v).

II.1.2.2.B. Soluciones para DRE

Se preparó una solución madre de FEX por pesada exacta y disolución del principio activo en HCl 0,1 M-MeOH (80:20, v/v) en un matraz aforado de 100 mL, siendo su concentración final 100,1 mg L⁻¹. Para el caso de PEF, la solución madre empleada fue aquella usada para las determinaciones con PLS.

Para el conjunto de calibración se utilizaron 5 soluciones para cada analito, preparadas por dilución conveniente de las soluciones madres en matraces aforados de 25 mL, usando como solvente una mezcla HCl 0,1 M-MeOH (80:20, v/v). El rango de concentraciones

finales de estas soluciones fue $20 - 60 \text{ mg L}^{-1}$ para FEX y $305 - 610 \text{ mg L}^{-1}$ para PEF.

Una solución de $200,8 \text{ mg L}^{-1}$ de FEX, utilizada luego como espectro divisor, fue preparada siguiendo un procedimiento similar.

Para el análisis de PEF en formulaciones comerciales se utilizó la misma solución preparada para PLS; para el caso de FEX se tomaron 2 mL de la solución preparada para PLS y se transfirieron a un matraz aforado de 10 mL llevándose a volumen con una mezcla HCl 0,1 M-MeOH (80:20, v/v).

II.1.2.2.C. Soluciones para CLAE

Las soluciones estándar para ambos analitos fueron preparadas mediante diluciones apropiadas de las soluciones madre correspondientes, mencionadas en el ítem *II.1.2.2.1*, en matraces aforados de 10 mL, que fueron llevados a volumen con una mezcla de ACN-MeOH (1:1, v/v). La curva de calibración fue realizada por duplicado para una serie de 5 muestras conteniendo FEX en el intervalo de concentraciones $60,2 - 361,4 \text{ mg L}^{-1}$. La curva de calibración de PEF fue llevada a cabo de manera análoga a la anterior, en el intervalo de concentraciones $244,2 - 732,6 \text{ mg L}^{-1}$.

Para evaluar el contenido de FEX y PEF en los comprimidos, se tomó un volumen de 2 mL exactamente medidos del sobrenadante de la primera dilución realizada sobre la muestra empleada para PLS, que se transfirió a un matraz aforado de 10 mL, llevándose a volumen con ACN.

II.1.2.3. Soluciones de Hidroclorotiazida y Clorhidrato de Propranolol

II.1.2.3.A. Soluciones para PLS

Las soluciones madre de HCT y PRO fueron preparadas disolviendo cantidades exactamente pesadas de los analitos con MeOH, en matraces aforados de 50 mL, y llevando a

volumen con el mismo solvente. Sus concentraciones finales fueron de 870 mg L^{-1} y 2800 mg L^{-1} , respectivamente. Diariamente fueron preparadas soluciones de trabajo, transfiriendo 5 mL exactamente medidos de las correspondientes soluciones madre a sendos matraces aforados de 50 mL y llevando a volumen con HCl 0,1 M.

Para la calibración, un conjunto de 24 mezclas sintéticas binarias fue preparado en matraces aforados de 25 mL, empleando volúmenes apropiados de las soluciones de trabajo en HCl 0,1 M para obtener concentraciones finales de los analitos en el intervalo $8,7 - 16,0 \text{ mg L}^{-1}$ para HCT y $14,0 - 51,5 \text{ mg L}^{-1}$ para PRO.

Tres conjuntos de nueve soluciones de validación, conteniendo mezclas de los principios activos en los intervalos de concentración de $9,57 - 14,79 \text{ mg L}^{-1}$ para HCT y $15,12 - 43,68 \text{ mg L}^{-1}$ para PRO, fueron preparados en matraces aforados de 25 mL, por dilución con HCl 0,1 M de volúmenes apropiados de las soluciones de trabajo.

Para la determinación del contenido de los principios activos en comprimidos, veinte comprimidos fueron molidos en un mortero hasta polvo fino, del cual se tomó una alícuota de aproximadamente 34 mg en el caso de comprimidos de 25/40 (HCT/PRO) y de alrededor de 50 mg cuando se trató de comprimidos 25/80 (HCT/PRO). Las alícuotas de polvo fueron transferidas a sendos matraces aforados de 25 mL a los cuales se les adicionó 12,5 mL de HCl 0,1 M y se agitó durante 30 minutos. Luego, los matraces fueron enrasados con el mismo solvente y se centrifugaron por 10 minutos a 5000 rpm. Finalmente, se tomaron 2 mL de cada sobrenadante, se transfirieron a sendos matraces aforados de 25 mL, que se llevaron a volumen con HCl 0,1 M.

II.1.2.3.B. Soluciones para DRE

Para la curva de calibración, cinco soluciones de PRO fueron preparadas conteniendo concentraciones en el intervalo de $14,0 - 51,5 \text{ mg L}^{-1}$.

Dichas soluciones fueron obtenidas a partir de diluciones, en matraces aforados de 25 mL, de volúmenes apropiados de la solución de trabajo de PRO consignada en el ítem *II.1.2.3.A*, llevándose a volumen con HCl 0,1 M. Un conjunto de 5 soluciones de HCT en el intervalo de concentraciones 8,7 – 16,0 mg L⁻¹ fue preparado siguiendo un procedimiento similar a éste.

II.1.2.3.C. Soluciones para CLAE

La solución madre de PRO fue preparada por pesada exacta del principio activo, que se transfirió cuantitativamente a un matraz aforado de 50 mL, llevando a volumen con fase móvil (MeOH-Solución reguladora de Fosfato de Trietilamonio 0,01 M, pH= 2,5, 15:85, v/v); su concentración final fue de 802 mg L⁻¹.

La solución madre de HCT fue preparada disolviendo en un matraz aforado de 50 mL una cantidad exactamente pesada del principio activo con 15 mL de MeOH y llevando luego a volumen con Solución reguladora de Fosfato de Trietilamonio 0,01 M, pH= 2,5. Su concentración final fue de 253 mg L⁻¹.

La curva de calibración fue realizada por duplicado, para una serie de 5 muestras conteniendo HCT en el intervalo de concentraciones 15 – 85 mg L⁻¹, obtenidas por dilución de volúmenes apropiados de la solución madre de HCT, utilizando matraces aforados de 25 mL y llevando a volumen con fase móvil.

La curva de calibración de PRO fue preparada de manera análoga a la anterior, en un intervalo de concentraciones de 40 – 160 mg L⁻¹.

Para la determinación de los analitos en los comprimidos, se tomaron alícuotas de 5 mL del sobrenadante de las muestras preparadas para PLS y se transfirieron a sendos matraces aforados de 25 mL, llevándose a volumen con fase móvil.

II.1.2.4. Soluciones de Hidroclorotiazida y Losartán Potásico

II.1.2.4.A. Soluciones para PLS

Las soluciones madre de LST y HCT fueron preparadas por pesada exacta y disolución de los principios activos en agua bidestilada, siendo sus concentraciones finales de 100 mg L^{-1} y 50 mg L^{-1} , respectivamente.

Las 16 mezclas sintéticas binarias de calibración para el control de dosis se prepararon por dilución de las correspondientes soluciones madre, llevada a cabo en matraces de 25 mL con agua bidestilada, encontrándose las concentraciones finales de HCT en el intervalo de $3,17 - 5,70 \text{ mg L}^{-1}$ y las de LST en el rango $10,08 - 20,18 \text{ mg L}^{-1}$, con relaciones variables entre las concentraciones de los componentes de las mezclas.

Para la evaluación del perfil de disolución, se preparó un conjunto de 24 soluciones binarias de calibración, por dilución con agua bidestilada de las soluciones madre, que fue llevada a cabo en matraces aforados de 25 mL. Las concentraciones finales de HCT se hallaron en el intervalo de $1,06 - 5,70 \text{ mg L}^{-1}$ y las de LST en el rango $3,95 - 20,18 \text{ mg L}^{-1}$, siendo variable la relación de concentraciones de los componentes en las mezclas.

Tres conjuntos de nueve mezclas sintéticas binarias de validación se prepararon por dilución apropiada con agua bidestilada de volúmenes seleccionados de las soluciones madre. La dilución fue llevada a cabo en matraces aforados de 25 mL, encontrándose las concentraciones finales de los analitos entre $3,59 - 5,28 \text{ mg L}^{-1}$ y $12,10 - 20,16 \text{ mg L}^{-1}$, para HCT y LST, respectivamente.

Para la determinación del contenido de los principios activos en comprimidos, veinte unidades fueron pulverizadas en un mortero hasta polvo fino y homogéneo, del cual se tomaron alícuotas exactamente pesadas equivalentes a 10 mg de LST y a 2,5 mg de HCT, las que fueron transferidas a sendos matraces aforados de 100 mL, a los cuales se les adicionó 70 mL de una mezcla MeOH-HCl 0,1 M (10:90, v/v). Los matraces se agitaron durante 15

minutos y luego fueron enrasados con el mismo solvente. Dichas soluciones fueron filtradas a través de un filtro de nylon de 20 μm , descartándose el primer mililitro. Del líquido filtrado se tomaron 5 mL, los cuales se transfirieron a distintos matraces aforados de 25 mL, los que se llevaron a volumen con agua bidestilada.

II.1.2.4.B. Soluciones para CLAE

Las soluciones madres de concentraciones 1,25 g L⁻¹ para HCT y de 2,51 g L⁻¹ para LST fueron preparadas disolviendo en ACN cantidades exactamente pesadas de los principios activos puros, transferidas a matraces aforados de 25 mL y llevando luego a volumen con el mismo solvente.

Una solución de trabajo de concentración 50,2 mg L⁻¹ de LST, fue obtenida por dilución de la solución madre en matraz aforado de 50 mL, llevando a volumen con acetonitrilo. Un procedimiento similar se realizó para obtener la solución de trabajo de HCT, de concentración 13,1 mg L⁻¹.

Para confeccionar la curva de calibración, se prepararon por dilución apropiada de las soluciones madre, dos conjuntos de 5 soluciones cada uno. La dilución fue llevada a cabo en matraces de 25 mL con fase móvil (ACN-Solución reguladora de Fosfatos 0,1 M, pH= 4,0, 35:65, v/v), siendo las concentraciones finales de 2,095 – 5,24 mg L⁻¹ para HCT y 10,04 – 20,08 mg L⁻¹ para LST.

Para la determinación del contenido de los principios activos en comprimidos se siguió el mismo procedimiento descrito para PLS, con la salvedad que las últimas soluciones fueron llevadas a volumen con fase móvil.

II.1.3. Equipamiento Utilizado para el Desarrollo de Métodos Quimiométricos Cuantitativos en el UV. Condiciones de Trabajo

II.1.3.1. Espectroscopia de absorción electrónica

Todas las mediciones de los espectros de absorción electrónica se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV-Vis marca Shimadzu modelo 1601 PC (Shimadzu Corp., Kyoto, Japón), controlado por el software UV-Probe, utilizando cubetas de cuarzo de 1,00 cm de paso óptico. Los barridos se hicieron a una velocidad de 1200 nm min⁻¹. Los espectros fueron obtenidos con una resolución nominal de 1 nm para todos los casos, salvo para la aplicación de DRE en la mezcla de FEX y PEF, donde la resolución fue de 0,1 nm.

II.1.3.2. Cromatografía líquida de alta eficiencia

Los análisis empleando CLAE se llevaron a cabo isocráticamente, a temperatura ambiente, empleando un cromatógrafo de líquidos marca Varian modelo ProStar (Varian, Inc., Palo Alto, EEUU), equipado con dos bombas isocráticas, un inyector marca Rheodyne modelo 725i, provisto de un rulo de muestra de 20 µL de capacidad y columnas de tipo C₁₈ (ODS2) o C₈ de la línea Luna (Phenomenex, Inc., Torrance, EEUU) de 4,6 mm x 25 cm, rellenas con partículas de 5 µm de diámetro promedio. Los volúmenes de inyección fueron de 20 µL, el caudal fue generalmente de 1 mL min⁻¹ y la detección se efectuó mediante un detector ultravioleta de longitud de onda variable.

Los datos, expresados como cuentas de área, se adquirieron y procesaron en una computadora personal tipo Pentium IV con el software Star v. 6.0 de Varian.

II.1.3.2.A. Acetaminofeno y Diclofenaco Sódico

Para determinar ACE mediante la técnica de CLAE fueron inyectados 20 µL de muestra, se empleó una columna Luna de fase estacionaria C₁₈ y 5 µm de tamaño de partícula y MeOH-H₂O (1:3, v/v) como fase móvil, con un caudal de 1,5 mL min⁻¹ según lo descrito

por la USP 30.⁶⁰ Para determinar DIC se inyectaron en el cromatógrafo 20 µl de muestra, empleándose una columna Luna con fase estacionaria C₈ de 5 µm de tamaño de partícula; la fase móvil fue una mezcla de MeOH-Solución reguladora de Fosfato 0,01 M, pH= 3,5 (70:30, v/v), con un caudal de 1 mL min⁻¹. Los picos de los analitos fueron identificados por comparación de los tiempos de retención observados con sus respectivos estándares detectados a 254 nm.

II.1.3.2.B. Clorhidrato de Pseudoefedrina y Clorhidrato de Fexofenadina

Para realizar la curva de calibración de FEX, se inyectaron en el cromatógrafo 20 µl de las soluciones estándar, empleándose una columna Luna con fase estacionaria C₈ de 5 µm de tamaño de partícula; la fase móvil fue una mezcla de ACN-MeOH-Solución reguladora de Fosfato de Trietilamonio 0,01 M, pH= 3,7 (26:26:48, v/v/v). El caudal fue de 1,2 mL min⁻¹ y la detección se hizo en el UV a 220 nm.

La curva de calibración de PEF fue llevada a cabo de manera análoga a la anterior. Se empleó una columna Luna con fase estacionaria C₈ de 5 µm de tamaño de partícula; la fase móvil fue una mezcla de ACN-MeOH-Solución reguladora de TEA Fosfato 0,01 M, pH= 7,8 (26:26:48, v/v/v), bombeada a razón de 1,2 mL min⁻¹, con detección en el UV a 220 nm.

II.1.3.2.C. Clorhidrato de Propranolol e Hidroclorotiazida

Para el análisis de los componentes activos en las formulaciones comerciales por un método de referencia se aplicó la metodología descrita en la USP 30.⁶⁰ Para realizar las curvas de calibración de HCT y PRO, se inyectaron en el cromatógrafo 20 µl de las soluciones estándar, empleándose una columna con fase estacionaria C₁₈ de 4 mm × 15 cm; la fase móvil fue una mezcla de MeOH-Solución reguladora de Fosfato de Trietilamonio 0,01 M, pH= 2,5 (15:85, v/v) con un caudal de 1,5 mL min⁻¹ y la detección se realizó a 270 nm.

II.1.3.2.D. Losartán Potásico e Hidroclorotiazida

Se empleó una columna Erbasil C₁₈ (Carlo Erba, Italia) y una fase móvil compuesta de ACN-Solución reguladora de Fosfatos 0,1 M, pH= 4,0 en proporciones 35:65 (v/v), con un caudal de 1 mL/min. La detección en el UV se llevó a cabo a 230 nm. Se inyectaron en el cromatógrafo volúmenes de muestra de 20 µl.

II.1.3.3. Ensayos de disolución

Se utilizó una estación de disolución marca Hanson (Hanson Research, Chatsworth, EEUU) modelo SR8 Plus, equipada con 6 vasos y configurada como “Aparato I” o “Aparato II” USP según la formulación estudiada.⁶⁰ Los ensayos se efectuaron a 37°C ± 0,5°C en condiciones de medio, volumen de medio, velocidad de agitación y tiempo acordes a las normas oficiales generales, o específicas cuando éstas estuvieron disponibles.

II.1.3.4. Centrifugaciones y agitación

Para llevar a cabo las centrifugaciones durante el análisis de las formulaciones farmacéuticas comerciales o preparadas en el laboratorio, se utilizó una centrífuga de mesa marca Gelectronic modelo G-42.

Las agitaciones se efectuaron en un agitador de vaivén, a razón de 60 movimientos por minuto, sobre muestras colocadas en matraces aforados dispuestos a 14 cm del centro del equipo.

II.1.3.5. Pesadas

Las pesadas se realizaron en una balanza analítica marca Ohaus, modelo Explorer (Pine Brook, EEUU). La calibración de la balanza se controló por pesada de una pesa patrón antes de comenzar cada pesada o serie de pesadas.

II.2. METODOLOGÍAS COMPUTACIONALES EMPLEADAS PARA EL DESARROLLO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS CUANTITATIVOS EN EL UV

II.2.1. Procesamiento Computacional de Datos Espectrales

Los espectros de absorción electrónica fueron grabados en formato ASCII para su posterior manipulación. Los archivos ASCII fueron transferidos a una computadora personal tipo Turion™ 64 y transformados mediante rutinas apropiadas escritas para Matlab R12 (Mathworks, Inc., Natick, EEUU), en matrices numéricas aptas para ser procesadas por las rutinas de análisis multivariable, también redactadas para Matlab.

II.2.2. Métodos Quimiométricos y Estadísticos – Software

La evaluación estadística de los datos se realizó empleando diferentes aplicativos. Procesos como la comparación de medias se llevaron a cabo mediante el empleo de rutinas apropiadas escritas para Matlab; otros estadísticos, como regresiones lineales y no lineales (Weibull), se realizaron empleando los programas OriginPro v. 7.5 (OriginLab, Inc., Northampton, EEUU). Las pruebas ANOVA, de Scheffe y de Homogeneidad de la Variancia (Levene) se realizaron empleando SPSS v. 9.0 (SPSS, Inc., Chicago, EEUU).

Todas las operaciones concernientes a diseño experimental fueron realizadas mediante el programa Design-Expert v. 7.0 (Stat-Ease, Minneapolis, EEUU).

Todas las rutinas de trabajo para el manejo de datos (conversión de formatos, suavizado, derivación, etc.) y los métodos quimiométricos desarrollados (DRE) o utilizados (PLS, PCR, etc.) en este trabajo de Tesis fueron escritos para Matlab.

II.2.3. Gráficos – Software

Las estructuras químicas fueron dibujadas empleando el programa ChemDraw Ultra v. 7.0 (CambridgeSoft Corp., Cambridge, EEUU); las Figuras se realizaron empleando las

rutinas de gráficos de Matlab, Excel 97 (Microsoft Corp., Seattle, EEUU) o el aplicativo OriginPro v. 7.5,

Las ecuaciones matemáticas se escribieron empleando el utilitario Math Type v. 5 (Design Science, Inc., Long Beach, EEUU).

II.3. ESTUDIOS SOBRE EL PERFIL DE DISOLUCIÓN DE FÁRMACOS

II.3.1. Equipamiento

Las pruebas de disolución fueron realizadas a $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ en un equipo de disolución Hanson SR8 Plus configurado como Aparato II (paletas) de la USP 30.⁶⁰

La cantidad de principio activo disuelto fue determinada espectrofotométricamente en celdas de cuarzo de 1,00 cm de paso óptico, empleando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1601PC controlado por el software UV-Probe.

Las determinaciones fueron realizadas contra un blanco de medio de disolución, sobre muestras filtradas, mediante la comparación con soluciones estándar conteniendo concentraciones conocidas del analito.

Las pesadas se realizaron en una balanza analítica marca Ohaus, modelo Explorer (Pine Brook, EEUU). La calibración de la balanza se controló por pesada de una pesa patrón antes de comenzar cada pesada o serie de pesadas.

II.3.2. Métodos Quimiométricos, Estadísticos y Gráficos – Software

Todos los cálculos de PCA-CR fueron realizados en Matlab. Los perfiles de disolución fueron confeccionados con OriginPro y las estadísticas referidas a f_1 y f_2 fueron computadas en Excel.

II.3.3. Muestras para la Clasificación de Comprimidos Según su Perfil de Disolución

II.3.3.1. Furosemida

Se estudiaron ocho lotes de comprimidos comerciales conteniendo 40 mg de furosemida por unidad de dosis, correspondientes a tres marcas diferentes. Se emplearon 900 mL de solución reguladora de Fosfatos (0,05 M, pH= 5,8) como medio de disolución, por vaso, según el procedimiento de la USP 30. Se utilizó un comprimido por cada vaso y cada prueba comprendió dos corridas de seis comprimidos cada una, para un total de 12 unidades por lote.⁶⁰

Cada curva de disolución fue construida con 18 puntos temporales; para ello, alícuotas de 3 mL fueron tomadas de cada vaso a los 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 26 y 30 minutos, filtradas y adecuadamente diluidas con el medio de disolución. La cantidad de analito disuelto fue determinada espectrofotométricamente a 274 nm.

II.3.3.2. Acetaminofeno

Tres marcas diferentes de comprimidos comerciales conteniendo 500 mg de acetaminofeno fueron estudiadas. Se empleó 900 mL de Solución reguladora de Fosfatos (0,05 M, pH= 5,8) como medio de disolución; una leve modificación del procedimiento de la USP 30 (velocidad de agitación a 30 rpm),⁶⁰ fue utilizada para aumentar la selectividad.¹⁴⁰

Se ensayó un comprimido por cada vaso y cada prueba comprendió dos corridas de seis comprimidos cada una, para un total de 12 unidades por lote. Cada curva de disolución fue construida con 10 puntos temporales, para lo cual se tomaron alícuotas de 3 mL a los 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 45 y 60 minutos, las que fueron filtradas y adecuadamente diluidas con el medio de disolución. La cantidad de principio activo disuelto fue determinada espectrofotométricamente en el máximo de absorción de acetaminofeno, a 243 nm.

II.4. ESTUDIOS SOBRE DISOLUCIÓN Y POLIMORFISMO CRISTALINO

II.4.1. Equipamiento

Las pruebas de disolución fueron realizadas a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ en un equipo de disolución marca Hanson modelo SR8 Plus configurado como Aparato I (cestas) de la USP 30.⁶⁰

La cantidad de principio activo disuelto fue determinada espectrofotométricamente en celdas de cuarzo de 1,00 cm de paso óptico, empleando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1601PC controlado por el software UV-Probe. Las determinaciones fueron realizadas contra un blanco de medio de disolución, sobre muestras filtradas, mediante la comparación con soluciones estándar conteniendo concentraciones conocidas del analito.

Los espectros en el IR para la verificación de identidad de los polimorfos fueron obtenidos con las muestras preparadas como mull de Fluorolube sostenidos entre dos pastillas de NaCl, con la ayuda de un espectrofotómetro marca Shimadzu, modelo Prestige 21 FTIR (Shimadzu Corp., Kyoto, Japón).

Las pesadas se realizaron en una balanza analítica marca Ohaus, modelo Explorer (Pine Brook, EEUU). La calibración de la balanza se controló por pesada de una pesa patrón antes de comenzar cada pesada o serie de pesadas.

Los estudios de termomicroscopia fueron llevados a cabo con un Microscopio con platina calefaccionada marca Ernst Leitz (Wetzlar, Alemania), modelo 350.

II.4.2. Métodos Quimiométricos – Software

Todos los cálculos fueron realizados en Matlab. Las rutinas utilizadas para PCA-CR fueron desarrolladas *ad hoc*. Los cálculos para SOM fueron corridos empleando rutinas Matlab pertenecientes a la “SOM toolbox”, de dominio público (<http://www.cis.hut.fi/projects/somtoolbox/>).

II.4.3. Muestras para el Estudio del Polimorfismo Cristalino

Tres lotes de cápsulas conteniendo proporciones constantes de Ludipress y los polimorfos I, II y III de FUR fueron preparados por mezclado de cantidades apropiadas de las formas polimórficas puras y el excipiente. Las distintas formas cristalinas de los polimorfos fueron obtenidas según los procedimientos descritos por Matsuda y Tatsumi.¹²⁵ La identidad de las formas polimórficas fue establecida en una etapa previa a la preparación de las cápsulas por espectroscopia FTIR con la ayuda de termomicroscopia.

Para preparar las cápsulas, los ingredientes correspondientes se pesaron exactamente y se mezclaron en un mezclador mecánico de vaivén a razón de 60 movimientos por minuto, durante tiempo suficiente para asegurar homogeneidad. El proceso de mezclado fue supervisado mediante la adquisición de espectros FTIR a diferentes intervalos de mezcla hasta observar consistencia entre dos series consecutivas. Finalmente, el polvo fue encapsulado. En general, 40 cápsulas por lote de cada forma fueron preparadas mediante encapsulado manual.

Un cuarto lote de cápsulas fue preparado a partir de material de comprimidos comerciales. Para ello, los mismos fueron previamente pulverizados de modo manual, el polvo resultante fue luego mezclado a homogeneidad y posteriormente encapsulado de modo manual.

II.4.4. Perfiles de Disolución

Los 4 lotes, correspondientes al comprimido comercial y a 3 diferentes polimorfos de FUR, fueron estudiados. Las características de liberación de los mismos fueron determinadas con un baño a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, empleando solución de HCl y KCl (pH= 2,2, 900 mL), preparada según indicaciones de la USP 30,⁶⁰ como medio de disolución, a una velocidad de rotación de 75 rpm.

Se usó un comprimido por cada vaso y cada prueba comprendió dos corridas de 6

unidades cada una para hacer un total de 12 comprimidos por lote. Durante cada experimento, alícuotas de 3 mL fueron tomadas del medio de disolución de cada vaso a los 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360, 420 y 480 minutos; las muestras fueron filtradas y adecuadamente diluidas con medio de disolución. La cantidad de FUR disuelta fue determinada espectrofotométricamente, tomando como base la absorción de las muestras a 274 nm. Cada curva de disolución estuvo conformada por un total de 17 puntos.

II.5. ANÁLISIS DE CARACTERES DE CALIDAD DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN

II.5.1. Muestras

Se empleó una serie de 86 aceites de oliva virgen provenientes de diferentes regiones de Italia (Abruzzo, Marche y Puglia) y pertenecientes a las temporadas de cosecha 2006 – 2007 y 2007 – 2008. Las fuentes naturales (olivos) se diferenciaron en términos de cultivar, grado de maduración, área de crecimiento y sistema de extracción (tipo, capacidad productiva y fabricante). Las muestras fueron almacenadas en la oscuridad, a temperatura ambiente, hasta el momento del análisis.

Para la determinación de TFA, un conjunto de 25 muestras fue seleccionado al azar a partir del lote original de muestras para conformar el juego de muestras de validación, mientras que el resto (61 muestras) fue utilizado para construir el modelo de calibración.

La determinación del índice de peróxidos (PV) fue realizada con un total de 34 muestras pertenecientes únicamente a la temporada de cosecha 2006-2007, utilizándose un conjunto de validación de 10 muestras que fue seleccionado al azar, mientras que las 24 muestras restantes fueron empleadas como conjunto de entrenamiento.

II.5.2. Instrumentación y Adquisición de Espectros

Todos los espectros fueron adquiridos empleando un espectrómetro marca Bruker,

modelo Tensor 27 (Bruker Optics, Karlsruhe, Alemania). El accesorio ATR utilizado estuvo equipado con un cristal de reflexión ZnSe 11 (Specac, Woodstock, EEUU). Los análisis fueron realizados a temperatura ambiente y los espectros fueron adquiridos (32 barridos/muestra o blanco) en el intervalo de 4000 a 700 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} , usando el software OPUS v. 6.0 (Bruker Optics, Karlsruhe, Alemania).

Se registró un solo espectro por muestra, en el modo absorbancia, empleando 1 – 1,5 mL del aceite uniformemente extendido sobre la superficie del cristal. Cada espectro fue adquirido contra su respectivo blanco, obtenido con la celda ATR limpia, seca y vacía. Antes de la obtención de cada nuevo espectro, el cristal ATR fue limpiado con un paño de celulosa impregnado en hexano y luego con agua destilada.

II.5.3. Pre-procesamiento de Datos y Modelos de Calibración

Los datos adquiridos fueron exportados desde OPUS en formato ASCII y procesados en una computadora personal tipo Pentium IV empleando rutinas de PLS escritas *ad hoc* para Matlab. Los modelos PLS para cada parámetro fueron calculados con el respectivo conjunto de muestras de entrenamiento. La estrategia de ventana móvil de ancho variable fue corrida con la ayuda de una rutina apropiada escrita para Matlab.¹⁴¹

II.5.4. Métodos Analíticos de Referencia

El índice de peróxidos fue determinado según el método oficial descrito en la norma CEE de Regulación Europea 2568/91 y sus enmiendas,¹³³ y se expresó como miliequivalentes de oxígeno por Kg de aceite ($\text{meqO}_2 \text{Kg}^{-1}$).

Las determinaciones fueron realizadas sobre muestras almacenadas durante tres meses en la oscuridad y a temperatura ambiente. Para la determinación de la composición de ácidos grasos, éstos fueron analizados como los correspondientes ésteres metílicos determinados

mediante cGC-FID en un cromatógrafo marca Perkin Elmer, modelo Clarus 500 (Perkin Elmer, Inc., Milán, Italia), después de tratamiento alcalino, según la técnica de Bendini y col.¹⁴² Los ésteres metílicos se prepararon mediante una reacción de trans-esterificación, mezclando 0,05 g del aceite disuelto en 2 mL de hexano con 1 mL de solución de KOH 2 N en MeOH.¹⁴³

II.6. ANÁLISIS DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN

II.6.1. Sustancias de Referencia

- **Hidroxitirosol:** Fue adquirido en EXTRASYNTHESE, Lyon Nord, Francia. Número de referencia 4986.
- **Oleuropeina:** Fue adquirida en EXTRASYNTHESE, Lyon Nord, Francia. Número de referencia 0204.
- **Tirosol:** Fue adquirido en EXTRASYNTHESE, Lyon Nord, Francia. Número de referencia 4834.
- **α -Tocoferol:** Fue adquirido en TCI Europe, Waterloo, Bélgica. Número de referencia T2309. Características de referencia: punto de fusión 3,5°C, densidad 0,95, rotación óptica $[\alpha]_{20}^{D 0.5} = 0.5^\circ$ (C=1, EtOH).

II.6.2. Soluciones Madre, Diluciones, Soluciones de Trabajo y Reactivos

La preparación de las soluciones madre de los testigos utilizados y los diferentes grupos de muestras de trabajo, incluyendo las de calibración y muestras sintéticas, se llevó a cabo por pesada exacta y disolución, seguida de dilución según el caso. Las soluciones preparadas fueron conservadas a 4°C y al abrigo de la luz. El hexano utilizado fue marca Merck, calidad PA. El MeOH (Merck, calidad PA) se utilizó tal como fue recibido. El resto de los reactivos empleados fue de grado PA.

II.6.3. Voltametría Diferencial de Pulso

Se usó un sistema de tres electrodos, consistente de un electrodo de referencia Ag/AgCl-KCl 3 M, un electrodo de hilo de platino como control y un electrodo de carbono vítreo (diámetro de 3 mm) como electrodo de trabajo. Las mediciones se efectuaron empleando un potenciómetro y galvanómetro portátil marca PalmSens (Palm Instruments BV, Houten, Holanda) conectado a una computadora portátil tipo Turion™ 64. El equipo se comandó a través del software PSLite v. 1.7.3.

II.6.4. Procesamiento Computacional de Datos Voltamétricos

Los voltamogramas fueron adquiridos en formato *.PSS (ASCII compatible). Los archivos fueron transferidos a una computadora personal tipo Turion™ 64 y transformados en matrices numéricas mediante rutinas apropiadas escritas para Matlab.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO III:

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE DICLOFENACO SÓDICO Y ACETAMINOFENO EN COMPRIMIDOS COMERCIALES

III.1.1. El Problema Analítico

La asociación farmacológica de DAINes, Diclofenaco (DIC) y Acetaminofeno (ACE), se utiliza en situaciones terapéuticas especiales como artritis reumatoide, osteoartritis y espondilitis anquilosante. Ambos principios activos pertenecen al mismo grupo farmacológico y actúan como inhibidores de las prostaglandina ciclo-oxigenasas I y II (COX-I y COX-II, respectivamente), enzimas que intervienen en la formación de prostaglandinas, conocidos mediadores de los procesos inflamatorios; sin embargo, en DIC predomina la acción anti-inflamatoria, mientras que en ACE sus principales efectos son analgesia y antipiresis.

Esta es una combinación farmacológica no codificada oficialmente en ninguna Farmacopea, por lo que no se cuenta con métodos oficiales para su control. Por otra parte, los métodos oficiales para el ensayo de los componentes individuales poseen varios inconvenientes si se los quiere utilizar para el análisis simultáneo de ambos analitos, por la disparidad de las condiciones de trabajo propuestas.

Actualmente, la asociación se halla ampliamente distribuida en el comercio nacional, disponiéndose de especialidades medicinales que contienen dos relaciones de masas diferentes, las cuales son 50/300 y 50/500 mg para DIC y ACE, respectivamente. Para el desarrollo del método se ha seleccionado un modelo basado en la primera relación de masas y

las marcas comerciales estudiadas fueron Paracetamol Forte (Laboratorio Raffo), Dioxaflex Gesic (Laboratorio Bagó) y Oxagesic (Laboratorio Beta).

El uso difundido de esta asociación farmacéutica ha estimulado el desarrollo de métodos analíticos para la determinación simultánea de sus componentes. Estos métodos incluyen espectrofotometría,¹⁴⁴ HPTLC,¹⁴⁵ CLAE,¹⁴⁶ GC,¹⁴⁷ SCFC¹⁴⁸ y Electroforesis Capilar Electrocinética Micelar (en inglés, MEK-CE).¹⁴⁹ También se ha descrito un método espectrofotométrico en fase sólida para la determinación de DIC en presencia de un exceso de cinco veces ACE.¹⁵⁰ Además, un método quimiométrico basado en el uso de redes neuronales artificiales ha sido propuesto para resolver esta mezcla, pero el mismo fue aplicado sólo sobre muestras sintéticas, con concentraciones y relaciones de analitos diferentes de las observadas en medicina humana.¹⁵¹

Debido a la relación de masas ampliamente desfavorable para DIC en la combinación terapéutica y el amplio solapamiento espectral en la zona de trabajo, evidenciado en la Figura III.1.1, se decidió desarrollar y validar un método quimiométrico basado en el uso de PLS acoplado a espectrofotometría UV en la región 230 – 300 nm, para poder determinar simultáneamente ambos principios activos sin que ello implicara separación previa, como lo requieren los métodos cromatográficos de la literatura, ya mencionados. Para poder determinar simultáneamente ambos principios activos con la exactitud y precisión requeridas para un producto farmacéutico, se procedió a desarrollar el siguiente esquema de trabajo:

- Verificar el cumplimiento de la ley de Beer en el intervalo de concentraciones de trabajo dentro del intervalo de longitudes de ondas seleccionadas, de 230 a 300 nm.
- Desarrollar, optimizar y validar un método multivariado PLS para cuantificar ambos analitos en la mezcla.
- Evaluar la idoneidad del método UV-PLS en relación con métodos cromatográficos que figuran en la literatura, como CLAE.

III.1.2. Diseño del Conjunto de Calibración y Optimización de los Parámetros Estadísticos

Se verificó el cumplimiento de la Ley de Beer para ACE y para DIC en el intervalo de concentraciones de 19,97 – 29,95 mg L⁻¹ y 2,94 – 4,42 mg L⁻¹ respectivamente, en la región del espectro electromagnético comprendida entre 230 y 300 nm. Basados en los resultados obtenidos, se seleccionaron intervalos de concentraciones de trabajo suficientes como para cubrir un intervalo equivalente a $\pm 30\%$ del valor declarado, un margen mayor al sugerido por la USP ($\pm 20\%$).⁶⁰ Las concentraciones finalmente elegidas fueron tales que las absorbancias de las soluciones más concentradas no superaron el valor de 1,2.

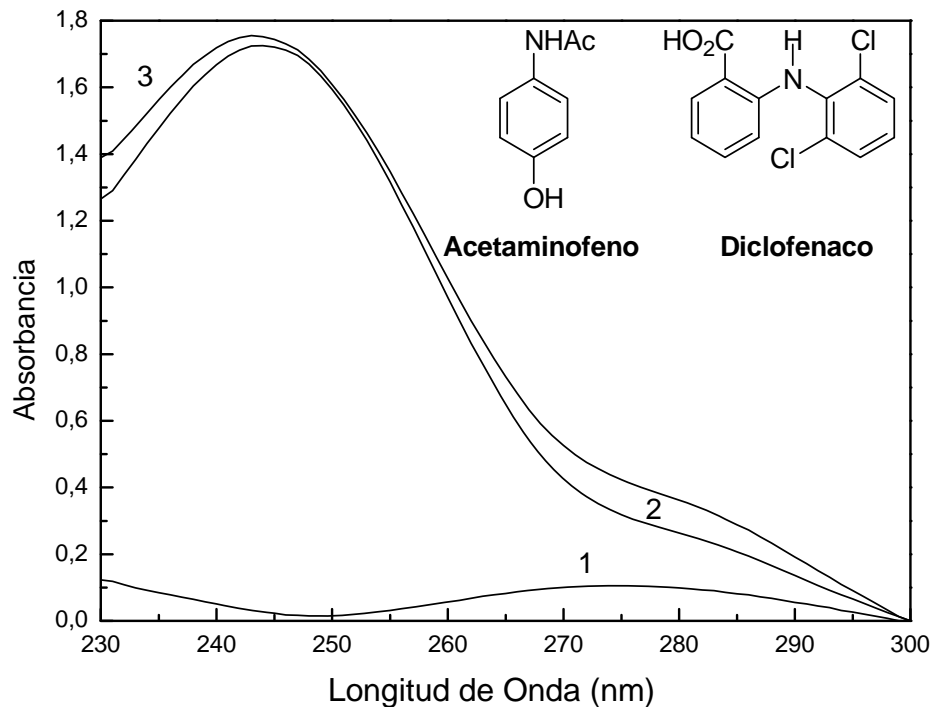


Figura III.1.1. Espectros de absorción electrónica de soluciones de 4,1 mg L⁻¹ de DIC (1), 27,5 mg L⁻¹ de ACE (2) y la mezcla en su relación terapéutica, proporciones 6:1, (3), en el intervalo de longitudes de onda 230 – 300 nm

A continuación, se preparó un conjunto de 16 mezclas de calibración de ambos analitos cuyas concentraciones fueron seleccionadas siguiendo un diseño factorial completo a cuatro niveles (4²), como se muestra en la Figura III.1.2.

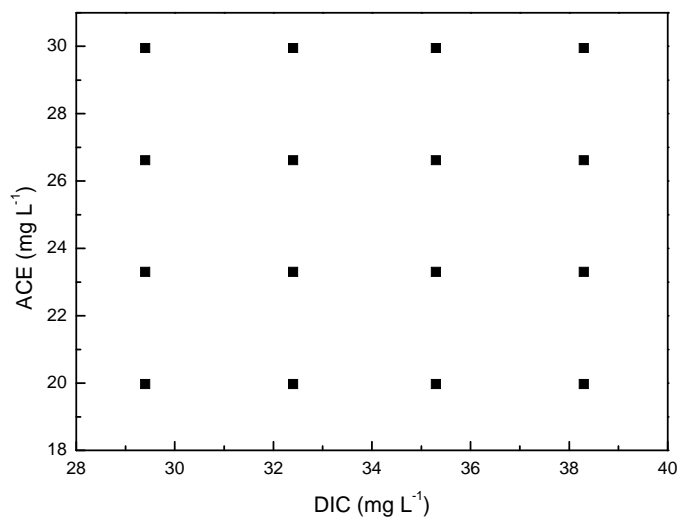


Figura III.1.2. Representación gráfica de la composición de las mezclas de Diclofenaco Sódico y Acetaminofeno para la etapa de calibración.

Luego, se levantaron sus espectros de absorción electrónica en el intervalo de 230 a 300 nm y se operó el algoritmo de selección de sensores de ventana móvil de ancho variable empleando el criterio de mínimo PRESS. Para cada analito, se eligió la zona de mínimo error y el número óptimo de factores siguiendo el criterio de la prueba F propuesto por Haaland y Thomas, evitando así un posible sobre-ajuste.¹⁰⁵ En la práctica, ello significó decidir el empleo de 2 factores para determinar ACE empleando su espectro UV en el intervalo espectral de 259 a 300 nm y concentraciones en el intervalo 19,97– 29,95 mg L⁻¹, y de 4 factores para el análisis de DIC entre 264 y 296 nm, en el intervalo de concentraciones 2,94 – 4,42 mg L⁻¹.

La validación interna se llevó a cabo aplicando el método “dejar uno afuera” y se analizaron las cifras de mérito resultantes, las cuales se muestran en la Tabla III.1.1. El coeficiente de regresión (r^2) y el error relativo porcentual de la predicción en calibración [REC (%)] obtenidos demuestran la calidad de las calibraciones para ACE y DIC. A pesar que el límite de cuantificación no es una cifra de mérito requerida por las Farmacopeas para métodos analíticos de control de dosis, resulta de gran importancia su cálculo para verificar

que el intervalo de trabajo no sea vecino al mismo. Del análisis de la sensibilidad, la selectividad y los estimadores de dispersión del método [PRESS, RMSD y REC (%)], se desprende que el mismo cumple ampliamente con los requisitos, para el fin propuesto.

Tabla III.1.1. Análisis simultáneo de DIC y ACE por UV-PLS. Parámetros críticos de la calibración.

Parámetro de Interés	ACE	DIC
Intervalo espectral (nm)	259 – 300	264 – 296
Intervalo de concentraciones (mg L ⁻¹)	19,97 – 29,95	2,94 – 4,42
Número de factores (LVs)	2	4
PRESS [(mg L ⁻¹) ²]	0,24	0,058
RMSD (%)	0,40	1,09
REC (%)	0,45	1,12
LOQ (mg L ⁻¹)	1,73	0,58
LOD (mg L ⁻¹)	0,52	0,175
r ²	0,9993	0,9966
Selectividad (SEL)	0,52	0,31
Sensibilidad (SEN)	0,06	0,013
Sensibilidad analítica [(γ), (mg ⁻¹ L)]	3,03	5,31
Mínima diferencia de concentración (mg L ⁻¹)	0,33	0,19

Puesto que la calidad de un modelo se relaciona con su capacidad de explicar los espectros a partir de los cuales se construyó, se analizaron los residuos espectrales de la calibración en los intervalos de trabajo correspondientes a los respectivos analitos. Dichos residuos fueron aleatorios y, en ambos casos, los mismos resultaron menores a 10⁻³ unidades de absorbancia.

III.1.3. Validación del Método Mediante el Uso de Muestras Sintéticas

La exactitud y la precisión del método propuesto fueron evaluadas utilizando 3

conjuntos de 6 mezclas sintéticas distintas a las del conjunto de calibración, todas ellas en el intervalo de trabajo válido; los resultados de esta validación externa se muestran en la Tabla III.1.2.

Para determinar la exactitud del método se calcularon los porcentajes de recuperación de ambos analitos en cada uno de los 3 conjuntos de mezclas, los que resultaron en todos los casos cercanos al 100%. Los mismos presentaron además valores de desviación estándar aceptables, que señalaron la calidad de la repetibilidad del ensayo propuesto.

Tabla III.1.2. Exactitud y precisión de la determinación simultánea de ACE y DIC por PLS.

Parámetro de interés	ACE			DIC		
<i>Exactitud</i>						
Intervalo de concentración (mg L ⁻¹)	21,46 – 28,95			3,16 – 4,27		
Número de muestras (N)	6	6	6	6	6	6
Recuperación media (%)	100,1	99,9	100,2	98,4	97,0	98,3
Recuperación media general (%)	100,0			97,9		
<i>Precisión</i>						
<i>Repetibilidad</i>						
Desviación estándar de la recuperación media general (%)	0,4	0,5	0,3	0,7	1,4	0,8
<i>Precisión intermedia</i>						
Número de mediciones (N)	18 (3 × 6)			18 (3 × 6)		
Variación entre días	0,26			6,62		
Variación dentro del día	2,29			14,6		
Cociente F^a	0,84			3,40		
RSD dentro del día (%)	0,13			0,97		

^a $F_{crit. (0,05, 2, 15)} = 3,68$.

Por su parte, la precisión intermedia se evaluó aplicando la prueba ANOVA a un factor a las 18 muestras. Las recuperaciones observadas aplicando este modelo sobre muestras sintéticas resultaron cercanas al 100%, su precisión se ajustó a los valores típicos de los ensayos oficiales ($RSD < 2\%$) y los resultados demostraron ser estables en el tiempo, presentando una precisión intermedia satisfactoria. Por ello, se concluyó que el método es exacto y preciso.

Para verificar la linealidad de respuesta del modelo UV-PLS en el intervalo de trabajo, se analizaron los porcentajes de recuperación de los analitos en el conjunto de muestras independientes, efectuándose una regresión lineal, de estos datos, frente a sus correspondientes valores de concentración real. En ambos casos, el hallazgo de pendientes nulas y ordenadas al origen que contienen al 100% en su intervalo de confianza, demostraron que el método mantiene un comportamiento lineal en todo el intervalo de trabajo, proveyendo recuperaciones cercanas al 100% en todos los casos.

III.1.4. Aplicación del Método Propuesto a Productos Farmacéuticos Comerciales. Control de Uniformidad de Dosis

Si bien el conjunto de pruebas de validación practicados demostraron la idoneidad del método, una forma adicional de asegurar la aptitud de un método consistió en demostrar su capacidad de ser aplicado a la resolución de problemas reales concretos.

Por ello, con el método analítico validado se procedió al análisis de comprimidos de tres marcas comerciales, observándose a través de los resultados obtenidos que las especialidades farmacéuticas ensayadas cumplieron con los requisitos generales en relación a lo declarado en sus respectivos rótulos.

Para lograr un mayor grado de confianza, los resultados registrados fueron además comparados con los obtenidos mediante la aplicación de sendos métodos CLAE para cada principio activo. Para ello, se utilizaron métodos propios de la USP,⁶⁰ cuyas condiciones

cromatográficas fueron levemente modificadas para disminuir el tiempo de cada ensayo. Los resultados obtenidos también permitieron verificar que todas las especialidades farmacéuticas ensayadas cumplieron con lo rotulado.

Por otra parte, los resultados de recuperación de los dos principios activos mediante las metodologías CLAE y PLS-UV, que pueden observarse en la Tabla III.1.3, fueron comparados estadísticamente aplicando una prueba t ; la misma permitió concluir que no existe diferencia significativa en los porcentajes de recuperación de ambos analitos, según sean éstos registrados por el método UV-PLS propuesto o por la metodología oficial basada en CLAE.

El método UV-PLS presentó una ventaja adicional, ya que la determinación simultánea de ambos analitos mediante un único conjunto de condiciones cromatográficas resultó ser extremadamente lenta y casi impracticable, con cromatogramas que tardaron más de 30 minutos en desarrollarse, mientras que las determinaciones empleando el método propuesto fueron realizadas en el término de pocos minutos.

Tabla III.1.3. Recuperación y RSD para ACE y DIC según los métodos UV-PLS y CLAE.

Analito Marca	Método	UV-PLS		CLAE		t^a
		Recuperado (%)	RSD (%)	Recuperado (%)	RSD (%)	
<i>Acetaminofeno</i>						
	Marca 1	99,2	1,2	98,7	1,6	0,37
	Marca 2	99,4	1,0	98,2	0,6	3,12
	Marca 3	100,5	0,7	98,9	1,5	2,31
<i>Diclofenaco</i>						
	Marca 1	106,9	0,7	106,4	0,6	1,86
	Marca 2	107,2	0,8	107,6	0,7	1,14
	Marca 3	100,7	0,9	100,0	0,7	2,24

^a $t_{(0,005, 10)} = 3,17$.

III.1.5. Aplicación del Método Propuesto a Productos Farmacéuticos Comerciales. Preparación de Perfiles de Disolución.

Otra aplicación que sirvió para demostrar la idoneidad del método desarrollado, fue la confección simultánea de perfiles de disolución de los dos principios activos presentes en el fármaco. El método pudo ser aplicado para tal fin, debido a su convenientemente bajo límite de detección, así como a su amplio intervalo de trabajo para ambos analitos.

Los resultados obtenidos permitieron construir los perfiles de disolución para ambos analitos, los cuales se pueden observar en la Figura III.1.3.

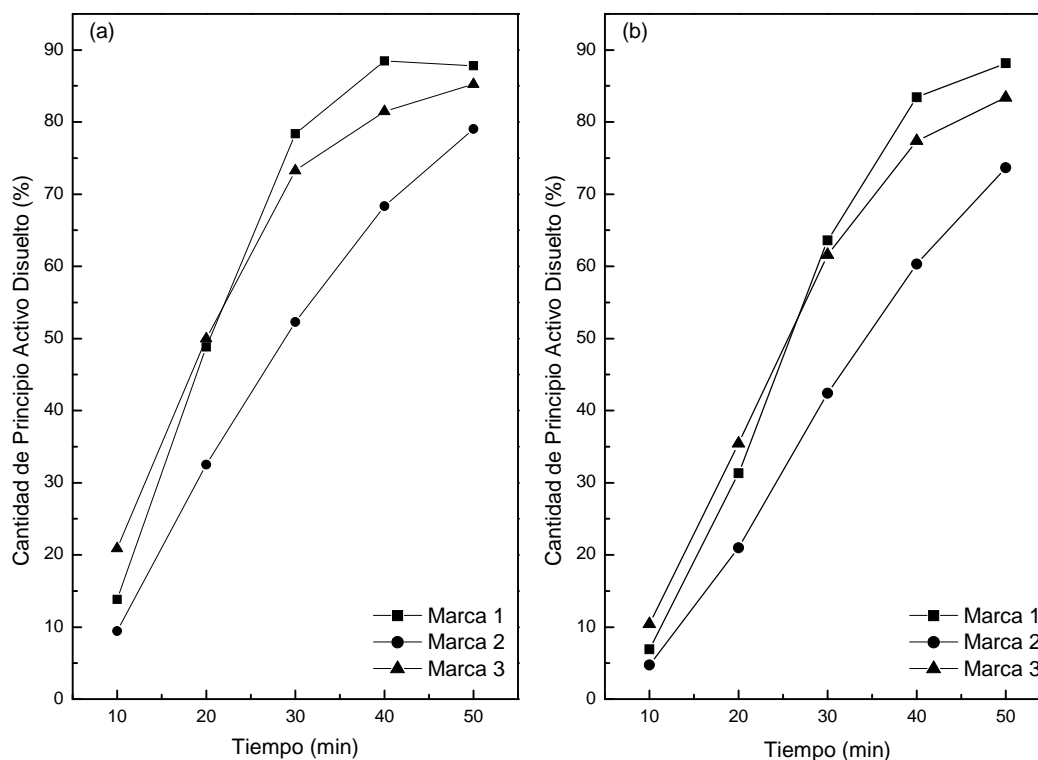


Figura III.1.3. (a) Perfiles de disolución para ACE para cada una de las marcas ensayadas; (b) perfiles de disolución de DIC para las tres marcas comerciales analizadas.

Por otra parte, los datos registrados para ACE y DIC fueron ajustados a un modelo matemático con el fin de estudiar el fenómeno de disolución. Para dicha tarea se cotejaron algunos de los modelos matemáticos, detallados en la Sección I.3.1.5.B, y se estudió la bondad de su ajuste empleando el cálculo de la suma de los cuadrados de los errores (ψ^2)

como estimador, ya que r^2 no es válido para comparar modelos con distinto número de parámetros. El modelo que describe la sigmoidea Weibull presentó el mejor ajuste; los parámetros de las curvas ajustadas para ambos analitos en cada marca se consignan en la Tabla III.1.4.

La ecuación sigmoideal de Weibull es uno de los modelos más usados para ajustar fenómenos de disolución, como se desarrolló en la Sección I.3.1.5.B.

$$\text{Principio Activo Disuelto (\%)} = A \times [1 - e^{-(k \times t)^\beta}] \quad [\text{III.1}]$$

La fórmula que representa dicha función se muestra en la Ecuación III.1, donde A es la máxima concentración de principio activo disuelto, mientras que los parámetros k y β determinan características de la curva, como su forma sigmoidea y lo empinado de la zona de crecimiento.

Tabla III.1.4 Determinación simultánea de los perfiles de disolución de comprimidos comerciales de ACE y DIC. Parámetros de ajuste de la ecuación de Weibull.

Analito	Acetaminofeno		
Parámetro	Marca 1	Marca 2	Marca 3
A	85,9 ± 0,9	90,7 ± 0,3	85,3 ± 0,5
β	2,4 ± 0,2	1,67 ± 0,03	1,69 ± 0,07
k	0,050 ± 0,001	0,0288 ± 0,0002	0,0496 ± 0,0008
ψ^2	5,34	0,55	1,68

Analito	Diclofenaco		
Parámetro	Marca 1	Marca 2	Marca 3
A	92 ± 1	87 ± 1	108 ± 1
β	1,8 ± 0,2	1,2 ± 0,6	1,2 ± 0,1
k	0,053 ± 0,002	0,036 ± 0,001	0,062 ± 0,002
ψ^2	8,90	5,76	12,80

III.1.6. Conclusiones

Se desarrolló y validó un nuevo método analítico útil para la determinación simultánea de ACE y DIC en muestras sintéticas y formas farmacéuticas sólidas conteniendo esta asociación farmacológica. Se demostró que el método es exacto y preciso en el intervalo de concentraciones estudiado, que se encuentra por encima del límite de cuantificación de ambos analitos.

El procedimiento propuesto, basado en el análisis de espectros UV mediante el algoritmo PLS, permitió tanto la determinación simultánea de ACE-DIC como la construcción de perfiles de disolución para cada principio activo de esta combinación farmacéutica, a pesar del amplio solapamiento espectral que los mismos presentan, proporcionando resultados estadísticamente similares a los que daría lugar la aplicación de la metodología cromatográfica propia de la analítica farmacéutica oficial.

El método propuesto requiere un mínimo pre-tratamiento de las muestras y utiliza solventes y equipamiento más accesible y menos costoso que los métodos cromatográficos convencionales como CLAE, sumándole a ello ventajas inherentes a su mayor agilidad y velocidad.

III.2. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE CLORHIDRATO DE PSEUDOEFEDRINA Y CLORHIDRATO DE FEXOFENADINA EN MEZCLAS BINARIAS MEDIANTE ANÁLISIS MULTIVARIADO. COMPARACIÓN CON CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA

III.2.1. El Problema Analítico

La asociación medicamentosa entre Clorhidrato de Fexofenadina (FEX), un antihistamínico de segunda generación y Clorhidrato de Pseudoefedrina (PEF), un fármaco simpaticomimético de acción descongestiva, es utilizada para tratar casos de alergia y resfríos con pronunciada congestión nasal,¹⁵² debido a la acción complementaria de sus componentes.¹¹⁸ El producto se comercializa formulado en relación de masas 1:2, respectivamente.

PEF es componente de varios medicamentos y ha sido determinado analíticamente mediante diferentes métodos cromatográficos y espectroscópicos.¹⁵³ Sin embargo, métodos para la determinación de FEX como único analito son escasos.¹⁵⁴ En productos farmacéuticos, FEX ha sido cuantificado mediante reacciones de formación de complejos,¹⁵⁵ electroforesis capilar,¹⁵⁶ voltametría anódica¹⁵⁷ y CLAE con detección UV.¹⁵⁸ FEX también ha sido determinado en fluidos biológicos mediante voltametría anódica¹⁵⁷ y CLAE con diferentes detecciones, incluyendo UV,¹⁵⁹ espectrometría de masa¹⁶⁰ y fluorescencia.¹⁶¹ La formulación combinada FEX-PEF ha sido estudiada mediante CLAE¹⁶² y en muestras de plasma por medio de CLAE con detección empleando ionización por electrospray y espectrometría de masa en tandem,¹⁶³ así como mediante cromatografía de interacción iónica.¹⁶⁴ Por otra parte, recientemente el grupo de Maghoub dio a conocer un método espectrofotométrico para analizar simultáneamente FEX y PEF en sus productos combinados.^{97b}

Sin embargo, al no ser ésta una mezcla de principios activos codificada oficialmente, no se cuenta con métodos oficiales para su control, y varios de los métodos de la literatura adolecen de varios inconvenientes, que incluyen el uso excesivo de solventes, períodos prolongados de preparación de muestra, intervalos lineales inapropiados para el problema

propuesto y el requerimiento de equipos sofisticados o no disponibles en laboratorios analíticos de mediana complejidad, entre otros.¹⁶⁵

En el comercio nacional, la asociación FEX-PEF se halla disponible bajo los nombres comerciales de Allegra D (Laboratorio Sanofi-Aventis), Alercas (Laboratorios Casasco) y Alerfedine-D (Laboratorios Lazar), por lo que se consideró interesante desarrollar un método analítico alternativo para esta formulación, que estuviese libre de los defectos señalados en otras metodologías.

Para poder determinar simultáneamente ambos principios activos, utilizando el mismo método, sin que ello requiera separación previa o sendas diluciones de la muestra para cada analito, se planificó llevar a cabo las siguientes actividades:

- Desarrollar y optimizar un método multivariado PLS para cuantificar ambos analitos en la mezcla, empleando datos espectroscópicos en el UV.
- Validar el método desarrollado.
- Aplicar el método propuesto a la cuantificación de ambos analitos en muestras comerciales reales.
- Evaluar la aptitud del método UV-PLS en relación con resultados provenientes de aplicar métodos CLAE, tomados como referencia.^{153,154}
- Comparar la calidad predictiva de la metodología UV-PLS con resultados provistos por el método de DRE publicado.^{97b}

III.2.2. Selección del Intervalo de Longitudes de Onda de Trabajo

En la Figura III.2.1 se muestran los espectros de absorción electrónica de PEF y FEX y de una mezcla de ambos en su relación terapéutica, en la zona de 220 a 275 nm. A simple vista se puede observar que si bien ambos analitos absorben, FEX presenta coeficientes de extinción molar comparativamente muy elevados entre 220 y 230 nm, que producen una

desviación de la ley de Beer insubsanable a valores de absorbancia útiles para la cuantificación de PEF. Aún sin tomar en cuenta el error instrumental inherente a dicha zona del espectro, este detalle se percibió como una importante razón para descartar esa zona del espectro.

Por las mencionadas características de los espectros, se decidió tomar como intervalo de trabajo la zona entre 240 y 275 nm, ya que a longitudes de onda mayores ambos analitos no presentan absorción.

Si bien en esta región los analitos presentan un amplio solapamiento espectral, *a priori* se pensó que el problema de cuantificación podría ser resuelto satisfactoriamente mediante la aplicación del algoritmo PLS.

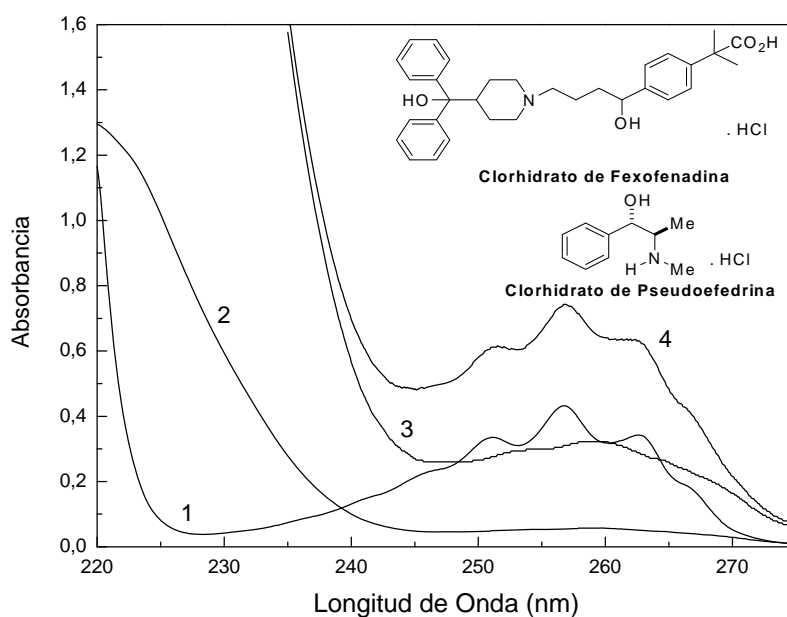


Figura III.2.1. Espectros de Absorción electrónica de: PEF a 460 mg L^{-1} (1); FEX a $40,2 \text{ mg L}^{-1}$ (2); FEX a 230 mg L^{-1} (3) y mezcla de PEF a 460 mg L^{-1} y FEX a 230 mg L^{-1} (4) en HCl 0,01 M-MeOH (80:20, v/v), en la región entre 220 y 275 nm.

III.2.3. Diseño del Conjunto de Calibración y Optimización de los Parámetros Estadísticos

Para efectuar la calibración se preparó un conjunto de 16 mezclas de calibración de ambos analitos, cuyas concentraciones fueron seleccionadas siguiendo un diseño factorial

completo a cuatro niveles (4^2), como se muestra en la Figura III.2.2, y se levantaron sus espectros de absorción electrónica en el intervalo de 240 a 275 nm.

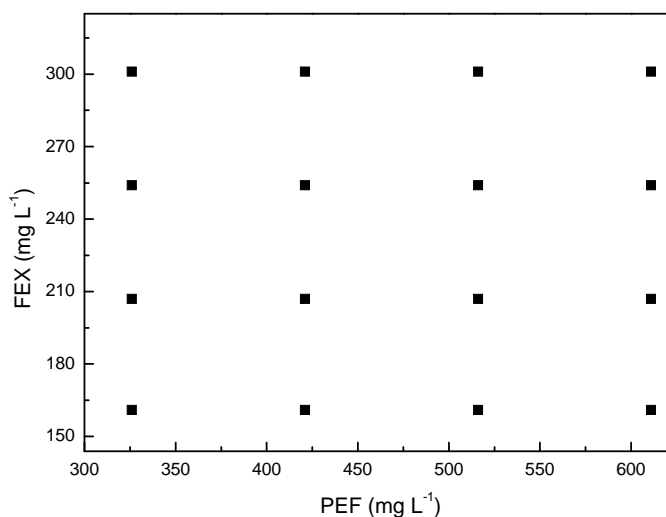


Figura III.2.2. Representación gráfica de la composición del conjunto de mezclas para la etapa de calibración de la mezcla PEF-FEX.

Para la selección del intervalo óptimo de longitudes de onda de calibración de cada analito, se aplicó el algoritmo de selección de sensores de ventana móvil de ancho variable, empleando el criterio de mínimo PRESS.

Tabla III.2.1. Análisis UV-PLS de mezclas de Clorhidrato de Fexofenadina y Clorhidrato de Pseudoefedrina. Variancia explicada por cada LV.

LV	FEX				PEF			
	Bloque de las X		Bloque de las Y		Bloque de las X		Bloque de las Y	
	Individual	Total	Individual	Total	Individual	Total	Individual	Total
1	95,06	95,06	46,43	46,43	96,14	96,14	51,40	51,40
2	4,93	99,99	53,49	99,92	3,85	99,99	48,46	99,86
3	0,00	100,0	0,03	99,96	0,00	100,0	0,05	99,91
4	0,00	100,0	0,02	99,98	0,00	100,0	0,06	99,97
5	0,00	100,0	0,01	99,99	0,00	100,0	0,02	99,99
6	0,000	99,999	0,006	99,998	0,000	99,999	0,007	99,994

Para cada analito, la zona del mínimo error y el número de factores óptimos fueron seleccionados siguiendo el criterio de la prueba F propuesta por Haaland y Thomas, para evitar posibles sobre-ajustes.¹⁰⁵

En el caso de FEX, el intervalo elegido fue entre 241 y 274 nm, el cual presentó la mejor selectividad y más adecuada recuperación del analito en las mezclas sintéticas. El número óptimo de factores fue de 2. Como se puede observar en la Tabla III.2.1, la variancia explicada con 2 LVs es superior al 99,9%, lo que deja afuera del modelo un 0,31% ($0,1^{0,5}$ %) de variación aleatoria, lo cual resulta ser ampliamente inferior al ruido instrumental.

Tabla III.2.2. Análisis UV-PLS de mezclas de Clorhidrato de Fexofenadina y Clorhidrato de Pseudoefedrina. Parámetros críticos de la calibración.

Parámetro de interés ^a	FEX	PEF
Intervalo espectral (nm)	241 – 274	242 – 258
Intervalo de concentración (mg L ⁻¹)	160,6 – 301,2	325,6 – 610,5
Número de factores (LVs)	2	3
PRESS [(mg L ⁻¹) ²]	40	480
RMSD (%)	0,74	0,72
REC (%)	0,67	0,75
r^2	0,999	0,999
Selectividad (SEL)	0,37	0,12
Sensibilidad (SEN)	0,0024	0,0003
Sensibilidad analítica (γ , L mg ⁻¹)	0,224	0,033
Mínima diferencia de concentración [mg L ⁻¹]	4,47	30,7

Por su parte, para PEF se emplearon 3 factores en el intervalo de 242 a 259 nm, donde la recuperación del analito y los errores del método resultaron minimizados con respecto a la utilización del espectro completo. Mediante un razonamiento análogo se justifica la elección 3 de LVs para analizar PEF.

Los parámetros críticos de la calibración se pueden observar en la Tabla III.2.2. Del

análisis de los mismos se desprende que el método es apto para los objetivos planteados, ya que sus indicadores de dispersión presentan valores bajos y tanto su sensibilidad y como su selectividad son apropiadas.

III.2.4. Validación del Método Mediante el Uso de Muestras Sintéticas

La exactitud y la precisión del método propuesto también fueron evaluadas con distintos grupos de muestras de validación independientes. Para validar la precisión intermedia en el intervalo de concentraciones de interés se prepararon 3 conjuntos de 9 mezclas sintéticas cada uno, que se analizaron en tres instancias diferentes, con los resultados que se muestran en la Tabla III.2.3.

Tabla III.2.3: Resultados de la recuperación de los analitos de muestras sintéticas.

Analito	Clorhidrato de Fexofenadina				Clorhidrato de Pseudoefedrina				
	Día N°	1	2	3	Media	1	2	3	Media
Recuperación (%)	99,8	98,1	99,1	99,0	99,9	98,4	99,0	99,1	
RSD (%) ^a	0,9	1,9	1,5	1,4	0,9	1,1	1,5	1,2	

^a Se emplearon nueve muestras por día y analito.

En todos los casos se observó una recuperación de ambos analitos cuantitativa, con baja dispersión entre los resultados, lo cual permitió concluir que el método propuesto es preciso al nivel de su repetibilidad.

La evaluación de los datos individuales de las 27 muestras preparadas por medio de un análisis de la variancia a un factor, cuyos resultados se detallan en la Tabla III.2.4, reveló que tanto para PEF como para FEX no existía diferencia estadística entre los grupos, con un nivel de significación del 5% ($\alpha = 0,05$), indicando que el método propuesto reunía las características de precisión adecuadas, a nivel de precisión intermedia.

Tabla III.2.4. Cuadro de resultados de la prueba ANOVA a un factor para las recuperaciones porcentuales de los tres grupos de mezclas sintéticas conteniendo FEX y PEF.

Clorhidrato de Fexofenadina					Clorhidrato de Pseudoefedrina				
Fuente de variación	SC	GL	CM	<i>F</i>	Fuente de variación	SC	GL	CM	<i>F</i>
Entre medias	7,94	2	3,97	1,17	Entre medias	1,59	2	0,80	0,40
Dentro del grupo	81,16	24	3,38	-	Dentro del grupo	48,21	24	2,01	-
Total	89,10	26	-	-	Total	49,80	26	-	-

SC: Suma de cuadrados; GL: Grados de libertad; CM: Cuadrado medio de error.

F: Cociente *F* observado; $F_{\text{crit}(0,05, 2, 24)} = 3,40$.

Por otra parte, el análisis de las recuperaciones individuales de un conjunto de nueve muestras sintéticas (Tabla III.2.5), permitió evaluar la exactitud del método.

Tabla III. 2.5. Demostración de la exactitud del método.

Muestra N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Media	RSD
FEX (mg L ⁻¹)	210,1	243,3	298,6	210,1	243,3	298,6	210,1	243,3	298,6		
Recup. (%)	100,2	98,3	98,9	99,5	100,3	100,0	100,1	101,5	99,3	99,8	0,9
PEF (mg L ⁻¹)	417,4	417,4	417,4	483,0	483,0	483,0	549,2	549,2	549,2		
Recup. (%)	99,0	98,7	100,9	100,9	98,9	100,3	99,5	99,8	100,8	99,9	0,9

La regresión lineal del porcentaje de recuperación frente a concentración real de cada analito en la muestra, dio lugar a las ecuaciones cuyos parámetros se detallan en la Tabla III.2.6. El método demostró ser exacto, ya que las rectas ajustadas muestran ordenadas al origen que contienen al 100% de recuperación en su intervalo de confianza del 95%. Además, el método demostró no poseer sesgo en la predicción debido a que la pendiente de la recta de regresión no fue estadísticamente distinta de cero, lo que implica que no existe variación de la recuperación con la concentración de la muestra, en el intervalo de trabajo.

Tabla III.2.6. Parámetros de la regresión de la recta de regresión Recuperado (%) vs. Concentración Real (mg L^{-1}) para Clorhidrato de Fexofenadina y Clorhidrato de Pseudoefedrina.

Parámetro	FEX	PEF
Número de muestras (N)	9	9
Pendiente \pm SD	$-0,007 \pm 0,009$	$0,004 \pm 0,006$
Intervalo de confianza de la Pendiente ^a	$-0,024 - 0,010$	$-0,007 - 0,015$
Contiene el “0”	SI	SI
$y_0 \pm$ SD	$101,4 \pm 2,2$	$98,0 \pm 2,8$
Intervalo de confianza de y_0 ^a	$97,3 - 105,5$	$92,8 - 103,2$
Contiene el “100%”	SI	SI

^aLos intervalos de confianza fueron calculados utilizando $t_{(0,95,8)} = 1,86$.

Por otra parte, al efectuar las regresiones lineales entre las concentraciones reales de cada analito frente a los correspondientes valores predichos, se obtuvieron las rectas cuyos parámetros se detallan en las Ecuaciones III.2 y III.3. Asimilando la concentración predicha de analito a la respuesta instrumental, estos resultados indicaron claramente la linealidad del método en el intervalo estudiado. Por otra parte, los resultados obtenidos pasaron la comparación conjunta de “ordenada al origen cero” y “pendiente unidad” con un nivel de confianza del 95%, indicando que el método provee resultados exactos y no sesgados.¹⁶⁶

$$[\text{FEX}]_{\text{predicho}} = (4,4 \pm 5,5) + (0,98 \pm 0,02) \times [\text{FEX}]_{\text{real}}; r^2 = 0,9966; N = 9 \quad [\text{III.2}]$$

$$[\text{PEF}]_{\text{predicho}} = (-8,3 \pm 12,9) + (1,02 \pm 0,03) \times [\text{PEF}]_{\text{real}}; r^2 = 0,9952; N = 9 \quad [\text{III.3}]$$

III.2.5. Aplicación del Método Propuesto a Productos Farmacéuticos Comerciales. Comparación con Otras Metodologías

Con el método analítico validado se procedió al análisis de comprimidos de una de las marcas comerciales, para la cual se obtuvieron los resultados que se detallan en la Tabla III.2.7, todos ellos se encuentran dentro de los límites habitualmente oficiales para

comprimidos (90 – 110% de lo declarado en el rótulo).

Tabla III.2.7. Recuperación porcentual de FEX y PEF, aplicando el método UV-PLS.

Muestra Analito	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Media	RSD
FEX	97,4	98,0	98,4	97,0	97,0	96,7	97,8	98,0	98,0	97,5	0,6
PEF	104,6	104,8	104,4	103,8	104,2	104,2	104,0	104,4	104,6	104,3	0,3

Con el objeto de obtener una mayor confianza, los resultados fueron comparados con los obtenidos de la aplicación de sendos métodos CLAE para cada principio activo, basados en la literatura.^{158a} Las condiciones cromatográficas de ambos métodos fueron levemente modificadas con el objeto de disminuir el tiempo de la corrida.

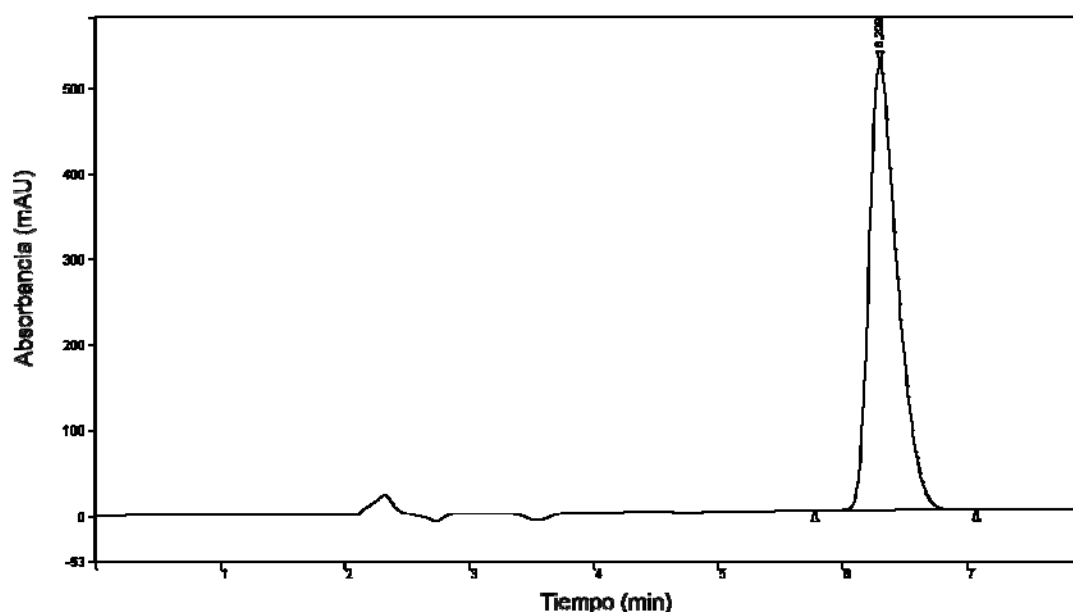


Figura III.2.3. Cromatograma típico de FEX.

La Figura III.2.3 muestra un cromatograma típico de FEX con detección UV a $\lambda = 220$ nm. La columna utilizada fue de tipo C₈, mientras que la fase móvil consistió de una mezcla de ACN-MeOH-Solución reguladora de Fosfato de Trietilamonio (0,01 M, pH= 3,7), en relaciones 26:26:48 respectivamente, bombeada a razón de 1,2 mL min⁻¹.

A los fines de la cuantificación, se construyó una curva de calibración con 5 soluciones

de distinta concentración de FEX en el intervalo de concentraciones 60,2 – 361,4 mg L⁻¹. La recta obtenida se consigna en la Ecuación III.4.

$$[\text{FEX, mg L}^{-1}] = -1,1 + 2,92 \times 10^{-5} \text{ AUC}; r^2 = 0,9996; N = 5 \quad [\text{III.4}]$$

En la Figura III.2.4 se muestra un cromatograma típico de Clorhidrato de Pseudoefedrina empleando una columna C₈ y una fase móvil constituida por ACN-MeOH-Solución reguladora de Fosfatos (0,01 M, pH= 7,8) en relación 30:30:40 bombeado a razón de 1,2 mL min⁻¹. Para la determinación de este analito en los productos formulados se construyó una curva de calibración con 5 niveles distintos de concentración del principio activo.

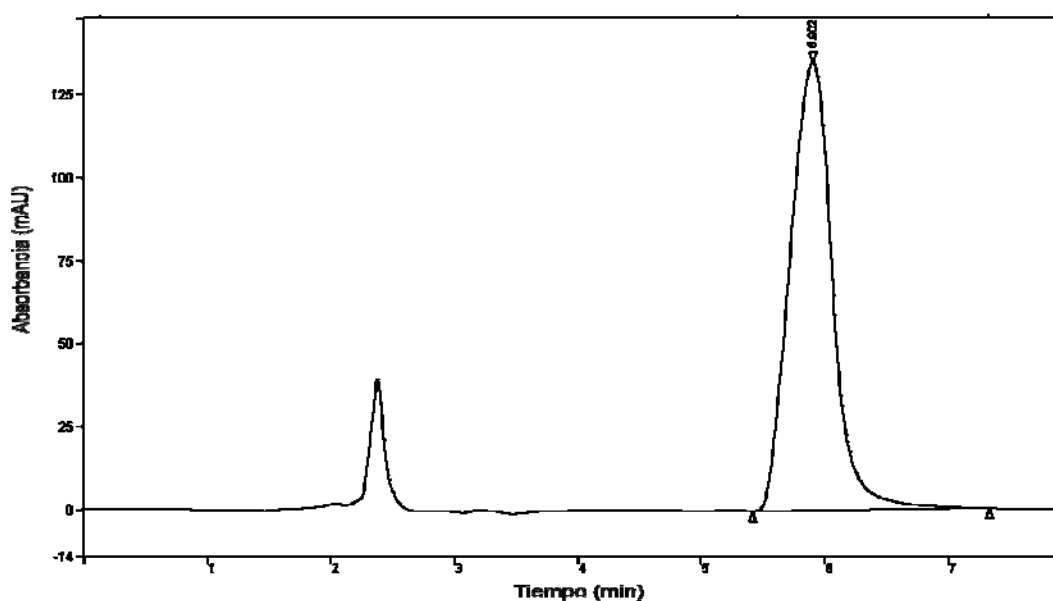


Figura III.2.4. Cromatograma típico de PEF.

La recta de regresión obtenida es la consignada en la Ecuación III.5, donde AUC es el área de la señal del analito, monitoreada a $\lambda = 220$ nm. El intervalo de concentraciones de trabajo para PEF fue 244,2 – 732,6 mg L⁻¹.

$$[\text{PEF, mg L}^{-1}] = 39,3 + 1,8 \times 10^{-5} \text{ AUC}; r^2 = 0,9940; N = 5 \quad [\text{III.5}]$$

La misma especialidad farmacéutica fue evaluada mediante la aplicación del método DRE, reproduciendo las condiciones experimentales y parámetros de la calibración exactamente como fueron reportados en la literatura.^{97b}

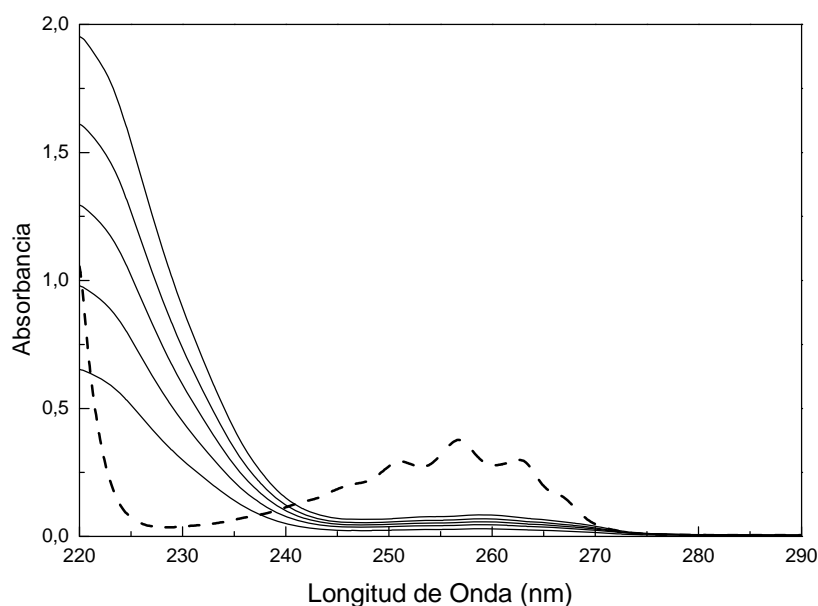


Figura III.2.5. Espectros puros de FEX en el intervalo de concentraciones de trabajo y espectro divisor de PEF (- -).

Para ello, se preparó un conjunto de calibración de FEX constituido por 5 soluciones de distinta concentración en el intervalo de 20 – 60 mg L⁻¹, cuyos espectros en el UV se adquirieron con una resolución de 0,1 nm (Figura III.2.5), a diferencia de los utilizados para PLS recogidos al nm. Estos espectros se dividieron por el espectro de PEF (407,0 mg L⁻¹) y la derivación de los mismos mediante el algoritmo de Savitzky-Golay generó los correspondientes espectros derivados. Las razones espectrales y sus derivadas se muestran en la Figura III.2.6.

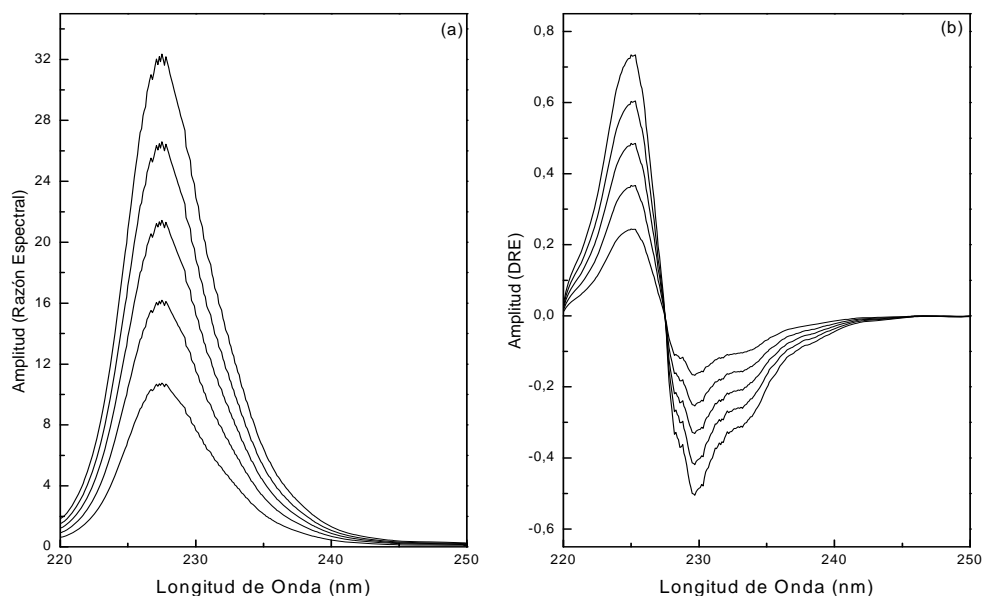


Figura III.2.6. Izquierda: Espectros de FEX divididos por el espectro de PEF a concentración $407,0 \text{ mg L}^{-1}$. Derecha: Trazados de la primera derivada de la razón espectral obtenida mediante el algoritmo de Savitzky-Golay.

Mediante operaciones similares se adquirieron los espectros en el UV de PEF en el intervalo de concentraciones de trabajo de 305 a 610 mg L^{-1} (Figura III.2.7); se utilizó un espectro de FEX de concentración $200,8 \text{ mg L}^{-1}$ como divisor, y los espectros cociente resultantes se derivaron para dar los trazados que se muestran en la Figura III.2.8.

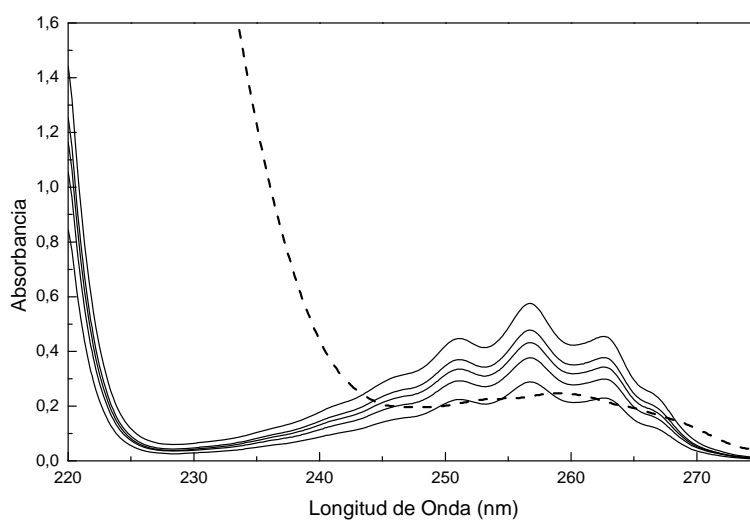


Figura III.2.7. Espectros puros de PEF a las concentraciones de trabajo y el espectro divisor de FEX (- -).

Las series de espectros divididos y derivados (Figuras III.2.6 y III.2.8) permitieron construir las curvas de calibración, empleando las intensidades de la DRE a las longitudes de onda 225,1 nm y 255,1 nm para FEX y PEF, respectivamente, tal cual lo indicado en la literatura.^{97b} Tras efectuar la regresión lineal de los datos, se obtuvieron las rectas de calibración que se detallan en las Ecuaciones III.6 y III.7.

$$[\text{FEX, mg L}^{-1}] = 0,0 + 82,9 \text{ INT}_{225,1}; r^2 = 0,9997; N = 5 \quad [\text{III.6}]$$

$$[\text{PEF, mg L}^{-1}] = 13 + 2,17 \times 10^4 \text{ INT}_{255,1}; r^2 = 0,9977; N = 5 \quad [\text{III.7}]$$

Cabe destacar que en este método, la cuantificación de los compuestos debe realizarse por separado por una limitación inherente al mismo y porque en la relación terapéutica a concentraciones donde FEX cumple con la Ley de Beer, PEF no puede cuantificarse con exactitud y precisión apropiadas, y viceversa. Ello obliga a realizar distintas diluciones del producto formulado para poder cuantificar ambos analitos.

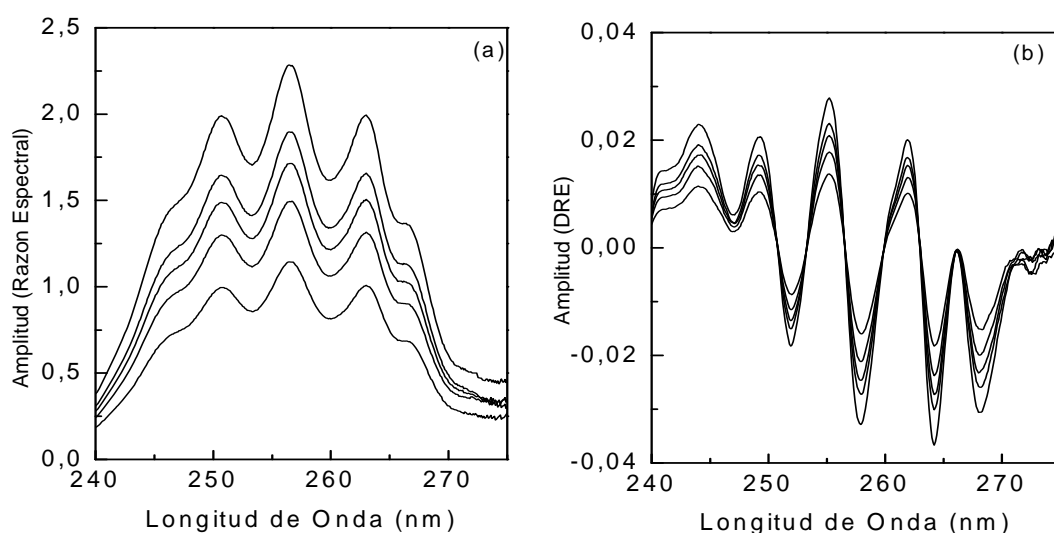


Figura III.2.8. Izquierda: Razón de los espectros de PEF y el divisor de FEX ($200,8 \text{ mg L}^{-1}$); Derecha: Primera derivada de la razón espectral de PEF.

El método DRE reproducido fue validado empleando un conjunto de cinco muestras, mostrando recuperaciones de FEX de $98,8 \pm 1,2\%$ y de $101,1 \pm 1,4\%$ para PEF, resultados considerados satisfactorios. La Tabla III.2.8 resume los parámetros más relevantes de la calibración para la determinación de FEX y PEF, empleando el método DRE.

Tabla III.2.8. Parámetros de la calibración para determinar FEX y PEF, empleando DRE.

Parámetro de interés	FEX	PEF
<i>Calibración</i>		
Longitudes de onda (nm)	220 – 245	240 – 275
Número de estándares (<i>N</i>)	5	5
Intervalo de concentraciones (mg L ⁻¹)	20,1 – 60,2	305,3 – 610,5
Niveles de concentración (mg L ⁻¹)	20,1; 30,1; 40,2; 50,2; 60,2	305,3; 407,0; 457,8; 508,8; 610,5
Concentración del espectro divisor (mg L ⁻¹)	407,0 (PEF)	200,8 (FEX)
Longitud de onda de medida (nm)	225,1	255,1
<i>Validación</i>		
Nº de muestras de validación (<i>N</i>)	5	5
Intervalo de concentraciones (mg L ⁻¹)	30,5 – 50,7	310,8 – 503,0
Niveles de concentración (FEX/PEF, mg L ⁻¹)	30,4/310,8; 40,6/402,4; 50,7/503,0; 30,4/503,0; 50,7/301,8	
Recuperación \pm RSD (%)	$98,8 \pm 1,2$	$101,1 \pm 1,4$

A los fines de comparación, los resultados de la recuperación porcentual de los distintos métodos para ambos principios activos pueden observarse en la Tabla III.2.9. Posteriormente mediante la aplicación de la prueba estadística ANOVA (Tabla III.2.10) se concluyó que al menos uno de los métodos sería estadísticamente distinto de los demás.

Aunque *a priori* se observó que el grupo de datos de recuperaciones correspondientes al método DRE para ambos principios activos presentaba una diferencia notable con respecto a los restantes, se procedió a efectuar la demostración estadística correspondiente.

Tabla III.2.9. Recuperación porcentual comparada para FEX y PEF, según los métodos UV-PLS, CLAE y DRE.

Muestra	Clorhidrato de Fexofenadina			Clorhidrato de Pseudoefedrina		
	UV-PLS	CLAE	DRE	UV-PLS	CLAE	DRE
1	97,4	98,5	91,4	104,6	105,9	102,4
2	98,0	99,0	91,5	104,8	106,4	102,2
3	98,4	99,0	94,3	104,4	106,1	102,1
4	97,0	96,5	92,6	103,8	104,6	101,3
5	97,0	96,6	92,8	104,2	104,5	101,7
6	96,7	96,1	92,9	104,2	102,9	101,3
7	97,8	97,4	95,7	104,0	102,2	100,8
8	98,0	97,4	95,8	104,4	103,5	101,8
9	98,0	97,6	96,3	104,6	103,3	101,7
Promedio	97,5	97,6	93,7	104,3	104,4	101,7
RSD	0,6	1,1	1,9	0,3	1,5	0,6

Para ello se aplicó un análisis estadístico múltiple como es la prueba de Sheffe (Tabla III.2.11), luego que los tres métodos fueron catalogados como homoscedásticos. Con la aplicación de esta última prueba se concluyó que no existe diferencia significativa entre los métodos UV-PLS y CLAE, mientras que el método DRE difiere significativamente de los otros dos en la calidad de los resultados provistos.

A este hecho se suma, que el método DRE presentaría varios inconvenientes; la cuantificación de los analitos requiere espectros de una mayor resolución (0,1 nm) y no es simultánea, ya que debe hacerse por separado, sobre diluciones diferentes de las muestras incógnita.

Esta limitación se debe a que en el producto formulado, a concentraciones a las cuales la absorbancia de FEX obedece la ley de Beer, PEF absorbe muy pobremente, a pesar de ser la especie más abundante, y por ello no puede ser cuantificada con exactitud y precisión adecuadas.

Tabla III.2.10. Prueba ANOVA sobre la recuperación porcentual de Clorhidrato de Fexofenadina y Clorhidrato de Pseudoefedrina mediante los métodos UV-PLS, CLAE y DRE.

Clorhidrato de Fexofenadina					Clorhidrato de Pseudoefedrina				
Fuente de variación	SC	GL	CM	<i>F</i>	Fuente de variación	SC	GL	CM	<i>F</i>
Columna	103,4	2	51,69	27,23	Columna	48,48	2	24,24	24,31
Error	45,54	24	1,90	-	Error	23,93	24	99,69	-
Total	148,9	26	-	-	Total	72,41	26	-	-

SC: Suma de cuadrados; GL: Grados de libertad; CM: Cuadrado medio de error; *F*: Estadística *F* observada; $F_{crit (0,01, 2, 24)} = 6,66$.

Por otra parte, soluciones más concentradas, que permitirían cuantificar apropiadamente PEF, darían lugar a una predicción inaceptable de FEX. Además, la determinación de FEX, que requiere una dilución adicional de la muestra incógnita, se lleva a cabo a 225,1 nm donde el espectro divisor de PEF presenta pobre absorción, con importante variación en la región entre 222 y 228 nm. Estos factores tornan el cociente demasiado pasible de errores debido a ruido instrumental y convierten la calibración en una recta demasiado sensible a variaciones en el espectro divisor.

Tabla III.2.11. Prueba de Sheffe realizado sobre datos de porcentaje recuperado para Clorhidrato de Fexofenadina y Clorhidrato de Pseudoefedrina por los tres métodos utilizados.^a

	Clorhidrato de Fexofenadina	Clorhidrato de Pseudoefedrina
UV-PLS	X	X
CLAE	X	X
DRE	X	X

^aSe utilizó un valor de $\alpha = 0,05$.

De manera análoga, la determinación de PEF no está exenta de inconvenientes, ya que sus resultados se encuentran sutilmente influenciados por la longitud de onda de medida, como se muestra en la Figura III.2.9.

Además, el procedimiento publicado emplea un espectro divisor con una baja

concentración de FEX, que presenta absorbancias cercanas al ruido espectral en la región entre 250 a 260 nm, de interés para la cuantificación de PEF (Figura II.2.5), un detalle que ha sido parcialmente subsanado en este trabajo al emplear un divisor de una mayor concentración.

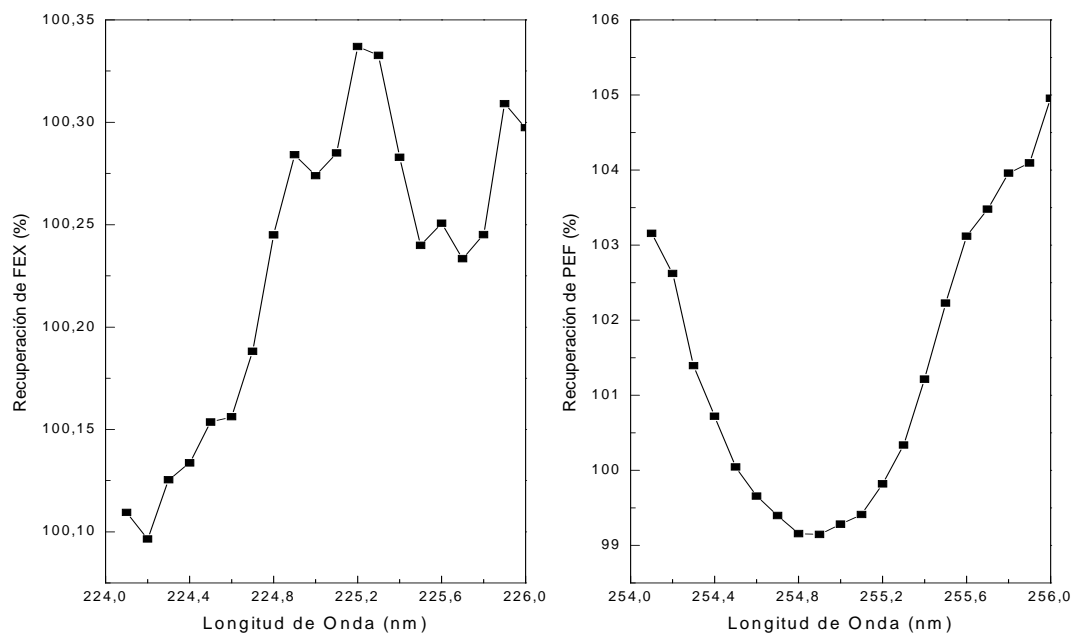


Figura III.2.9. Dependencia de la recuperación de FEX y PEF de la longitud de onda de medida, en el método DRE.

Por ello, en este escenario donde las condiciones son adversas para la determinación de ambos analitos mediante el procedimiento DRE, no resultaría inesperado el pobre desempeño del método, justificando además la necesidad de una metodología alternativa, como la propuesta.

III.2.6. Conclusiones

Se desarrolló y validó un método conveniente para la determinación simultánea de Clorhidrato de Pseudoefedrina y Clorhidrato de Fexofenadina en muestras sintéticas binarias, basado en la aplicación del algoritmo PLS a datos espectroscópicos de los analitos en el UV (UV-PLS). Esta técnica es simple, requiere instrumentación sencilla y consta de un menor

número de pasos que otros métodos alternativos disponibles. Además, la metodología propuesta presenta una buena repetibilidad, proveyendo resultados con exactitud y precisión satisfactorias desde el punto de vista de los requerimientos regulatorios vigentes.

Los resultados provistos por el método propuesto no presentan diferencia estadísticamente significativa frente a los obtenidos por CLAE. El método UV-PLS planteado demostró ser más robusto que DRE el cual a su vez mostró resultados discordantes con CLAE y PLS para ambos analitos.

III.3. DESARROLLO DE MÉTODOS UV-PLS, UV-PCR Y DERIVADA DE LA RAZÓN ESPECTRAL PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE HIDROCLOROTIAZIDA Y CLORHIDRATO DE PROPRANOLOL EN COMPRIMIDOS COMERCIALES

III.3.1. El Problema Analítico

La asociación de un diurético tiazídico como Hidroclorotiazida (HCT) con un antagonista β -adrenérgico no selectivo como el Clorhidrato de Propranolol (PRO) es una asociación farmacológica muy utilizada en el tratamiento de la hipertensión arterial.^{121,123,167} Los comprimidos de HCT-PRO están disponibles en el mercado local en dos diferentes presentaciones, 25 mg HCT combinados con 40 mg u 80 mg de PRO, bajo el nombre comercial de Propayerst[®] Plus (Laboratorio Wyeth).

Los métodos analíticos reportados para la cuantificación simultánea de esta asociación oficialmente reconocida⁶⁰ incluyen el acoplamiento de Densitometría a CCD,¹⁶⁸ espectroscopia a dos longitudes de onda,¹⁶⁹ espectroscopia de derivadas¹⁷⁰ y métodos CLAE.¹⁷¹

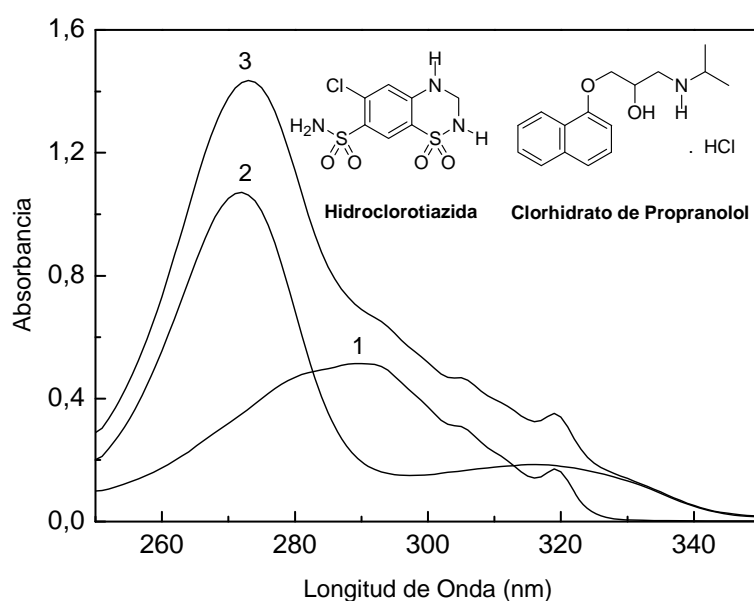


Figura III.3.1. Espectros de absorción electrónica de HCT a 13,92 mg L⁻¹ (1); PRO a 25,76 mg L⁻¹ (2) y la mezcla de ambos en su relación terapéutica (3).

El procedimiento oficial de la USP 30 consiste en un método CLAE para la valoración y de un método de extracción selectiva con solventes seguido de una determinación UV de los analitos para el ensayo de disolución.⁶⁰

Los espectros de absorción electrónica de HCT, PRO y la mezcla de los dos principios activos disueltos en HCl 0,01 M, en el intervalo 250 – 350 nm son exhibidos en la Figura III.3.1; en ella se puede observar un elevado solapamiento espectral entre ambos principios activos. A pesar de que PRO presenta absorción a longitudes de onda superiores a 330 nm, donde HCT no absorbe, la intensidad de dicha absorción es pequeña, por lo cual la misma no resultaría útil para fines analíticos.

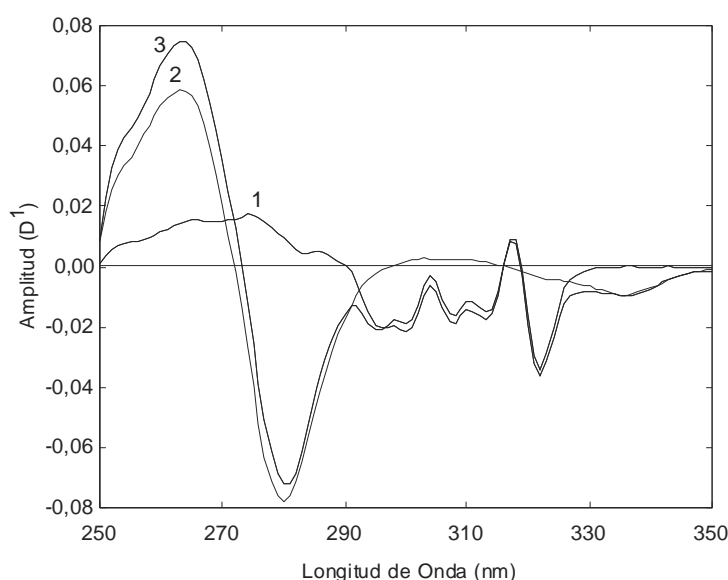


Figura III.3.2. Primera derivada de los espectros de absorción electrónica de HCT a 13,92 mg L⁻¹ (1), PRO a 25,76 mg L⁻¹ (2) y la mezcla de ambos (3) en su relación terapéutica.

Por su parte, la primera derivada de dichos espectros, que se muestra en la Figura III.3.2, no exhibe puntos con cruce de cero que resulten apropiados o convenientes para la cuantificación. A pesar de ello, se encuentran en la literatura métodos que han reportado la aplicación de técnicas de medición directa¹⁶⁹ y de primera derivada,¹⁷⁰ los cuales a la luz de estos detalles espectrales puede pensarse que proveerían resultados poco confiables, siendo incapaces de cumplir con los requisitos oficiales de exactitud y precisión.

Por estos motivos, se decidió desarrollar y validar métodos quimiométricos que permitiesen la determinación simultánea de ambos analitos en productos formulados farmacéuticos, sin que ello implicara separación previa, como lo requieren métodos cromatográficos o de extracción con solventes. Para ello se decidió estudiar el desempeño del acoplamiento de la espectrofotometría UV a los algoritmos PLS (UV-PLS) y PCR (UV-PCR) y por otro lado se procuró alcanzar el objetivo analítico mediante transformaciones de los datos según la técnica DRE.

Ambos métodos de calibración multivariada constituyen herramientas quimiométricas útiles para analizar mezclas complejas, ya que permiten una determinación rápida y simultánea de cada uno de los componentes de interés con una mínima preparación de la muestra y sin la necesidad de separaciones prolongadas, que consumen tiempo y esfuerzo.¹⁷²

Por otra parte, la metodología DRE ha sido propuesta como una alternativa útil para los casos en que la espectroscopia de derivadas tradicional produce resultados poco confiables.¹⁷³ En principio, la misma resulta una estrategia atractiva para resolver problemas como el propuesto, ya que es operacionalmente simple a la vez que potencialmente capaz de incrementar la selectividad, haciendo uso de las virtudes de la espectroscopia de derivadas de resaltar detalles espectrales menores.

Para poder determinar simultáneamente ambos principios activos con la exactitud y precisión requeridas para un producto farmacéutico, se planificaron y luego ejecutaron las acciones que configuran el siguiente esquema de trabajo:

- Verificar el cumplimiento de la ley de Beer en el intervalo de concentraciones de trabajo dentro del intervalo de longitudes de ondas seleccionadas.
- Desarrollar, optimizar y validar un método multivariado PLS para cuantificar ambos analitos en la mezcla.
- Desarrollar un método de basado en DRE capaz de efectuar la cuantificación simultánea

de ambos analitos en la mezcla.

- Evaluar la aptitud de los métodos UV-PLS y DRE en relación con métodos cromatográficos presentes en la literatura.

III.3.2. Diseño del Conjunto de Calibración y Optimización de Parámetros Estadísticos de la Calibración PLS

Debido a la existencia en el mercado local de especialidades farmacéuticas con dos diferentes proporciones de los analitos, se decidió utilizar un conjunto de 24 muestras de calibración conformando un diseño factorial completo asimétrico con 4 niveles para HCT y 6 niveles para PRO (Figura III.3.3), utilizando como solvente o medio de trabajo HCl 0,01 M. Los espectros de las mezclas fueron recogidos dentro de las dos horas de preparadas las mismas.

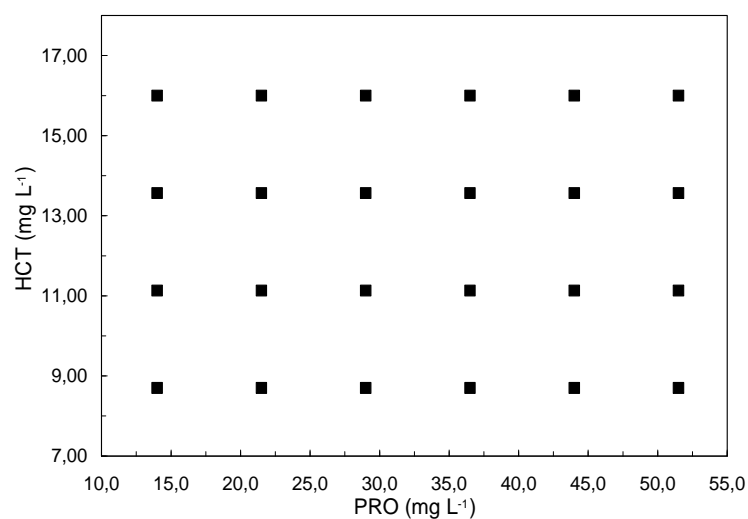


Figura III.3.3. Representación gráfica de la composición de las mezclas de HCT y PRO para la etapa de calibración. Diseño factorial asimétrico 4×6 .

Los cálculos para PLS fueron realizados sobre los datos centrados en la media. La elección del intervalo óptimo de longitudes de onda fue llevada a cabo empleando el algoritmo de la ventana móvil de ancho variable con el criterio del mínimo PRESS y el

esquema de validación cruzada interna consistente en “dejar uno afuera”. El número apropiado de LVs para el modelo de calibración fue hallado aplicando el criterio estadístico de Haaland y Thomas ($\alpha=0,75$).¹⁰⁵

Tabla III.3.1. Análisis UV-PLS de HCT y PRO. Parámetros de calibración del modelo PLS.

Parámetro de interés	HCT		PRO	
Intervalo espectral (nm)	250 – 350	277 – 294	250 – 350	297 – 319
Intervalo lineal (mg L ⁻¹)	8,7 – 16,0		14,0 – 51,5	
Niveles de concentración del conjunto de calibración (mg L ⁻¹)	8,7 – 10,4 – 13,9 – 16,0		14,0 – 17,9 – 25,8 28,0 – 36,4 – 51,5	
Niveles de concentración del conjunto de validación (mg L ⁻¹)	9,6 – 12,2 – 14,8		15,1 – 32,5 – 43,7	
Número de factores (LVs)	2	2	2	2
PRESS (mg L ⁻¹) ²	0,092	0,044	0,60	0,43
RMSD (mg L ⁻¹)	0,064	0,042	0,16	0,13
REC (%)	0,75	0,34	1,84	1,32
r^2	0,9996	0,9998	0,9999	0,9999
Selectividad	0,32	0,57	0,68	0,51
Sensibilidad	0,19	0,07	0,07	0,021
Sensibilidad Analítica [γ , (L mg ⁻¹)]	12,0	15,4	8,7	6,3
Mínima diferencia de concentración [γ^1 , (mg L ⁻¹)]	0,08	0,07	0,11	0,16
Límite de detección (mg L ⁻¹)	0,17	0,11	0,23	0,20
Límite de cuantificación (mg L ⁻¹)	0,56	0,37	0,78	0,66

La información relevante relacionada a la calibración del modelo tanto empleando el espectro completo como intervalos acotados de longitudes de onda resultantes de aplicar el algoritmo de ventana móvil de ancho variable,¹⁷⁴ se encuentra detallada en la Tabla III.3.1. En ambos tipos de modelo, las cifras de mérito resultantes, tanto RMSD como REC (%) y r^2 resultaron satisfactorios, indicando la calidad de los modelos y la aptitud del método para las determinaciones propuestas. En particular, los valores de r^2 cercanos a la unidad indicaron

una excelente correlación entre la respuesta del método (concentración predicha) y la concentración real de los analitos. Por su parte, aunque no es un requisito para este tipo de ensayos, se calcularon los valores de LOD y LOQ, los cuales confirmaron que el intervalo de trabajo se encuentra por encima de dichos valores, resultando en ese sentido idóneo para las determinaciones propuestas.

Sin embargo y como era de esperar, en ambos casos se pudo observar un mejor ajuste de los modelos con selección de intervalo de trabajo que al utilizar el espectro completo. También se observó una mejora de las cifras de mérito, para el intervalo reducido.

Paralelamente, y empleando la misma información espectroscópica, se corrió el algoritmo PCR para los intervalos espectrales seleccionados, el cual arrojó los resultados que se detallan en la Tabla III.3.2.

Tabla III.3.2. Análisis UV-PLS y UV-PCR de HCT y PRO en HCl 0,01 M. Parámetros estadísticos comparativos de los modelos de calibración.

Método	UV-PLS		UV-PCR	
	HCT	PRO	HCT	PRO
Intervalo espectral (nm)	277 – 294	297 – 319	277 – 294	297 – 319
Intervalo lineal (mg L ⁻¹)	8,7 – 16,0	14,0 – 51,5	8,7 – 16,0	14,0 – 51,5
Número de variables latentes (LVs)	2	2	2	2
PRESS [(mg L ⁻¹) ²]	0,044	0,43	0,044	0,43
RMSD (%)	0,32	0,69	0,32	0,69
REC (%)	0,34	1,32	0,32	1,32
r ²	0,9998	0,9999	0,9998	0,9999
Selectividad (SEL)	0,57	0,41	0,57	0,41
Sensibilidad (SEN)	0,07	0,021	0,07	0,021
Sensibilidad Analítica [γ , (L mg ⁻¹)]	15,3	6,31	15,3	6,23
Mínima diferencia de concentración [γ^{-1} , (mg L ⁻¹)]	0,065	0,158	0,065	0,161

El grado de similitud entre los resultados arrojados por ambas metodologías, puede ser explicado teniendo en cuenta lo expuesto en las Secciones I.5.3.2.A y I.5.3.2.B. PLS trata de explicar la variación de los espectros en base a la concentración del analito a determinar independientemente de su contribución parcial a la variación del espectro. Por otro lado PCR, trata de explicar la mayor cantidad de variación en los espectros, centrándose generalmente en los compuestos mayoritarios. En este caso los compuestos de mayor influencia en el espectro, son los analitos, por ser los únicos componentes de las mezclas de calibración y los únicos ingredientes que absorben en las formulaciones estudiadas; por ello se observaría tan sorprendente grado de similitud en las cifras de mérito.¹⁷⁵

Debido a que ambos métodos resultaron ser equivalentes en su capacidad predictiva, se optó por efectuar la validación simultánea de ambas metodologías.

III.3.3. Validación de los Métodos UV-PLS y UV-PCR Mediante el Uso de Muestras Sintéticas

A los fines de garantizar la calidad de los resultados, se estudió la exactitud y precisión del método UV-PLS. Para evaluar la exactitud del método, se calculó el porcentaje de recuperación del analito y su correspondiente desviación estándar a partir de un grupo de mezclas sintéticas con concentraciones diferentes y no colineales de cada analito, en el intervalo de trabajo.

Cuando se realizó el ensayo de exactitud para PLS y PCR también se obtuvieron recuperaciones congruentes. En ambos casos y para los dos analitos, las recuperaciones resultaron no ser significativamente distintas de 100% una vez sometidas a sendos ensayos *t* con un nivel de confianza del 99%.

Con respecto a la precisión, ésta se evaluó a nivel de repetibilidad, donde los valores hallados (0,7% y 0,8% para HCT y PRO, respectivamente) fueron considerados satisfactorios, y en el aspecto de precisión intermedia, aplicando un ANOVA a un factor a tres grupos de 9

mezclas sintéticas que se analizaron en tres instancias diferentes. Empleando un nivel de significación de 5% ($\alpha= 0,05$), se demostró que ambos métodos resultaron ser exactos y precisos (Tabla III.3.3).

Tabla III.3.3. Exactitud y precisión de la determinación simultánea de HCT y PRO por medio de los métodos UV-PLS y UV-PCR.

Parámetro	HCT			PRO		
<i>Exactitud</i>						
Número de muestras (<i>N</i>)	9			9		
Intervalo de concentración (mg L ⁻¹)	9,57 – 14,79			12,10 – 20,16		
Recuperación (%)	100,1			99,3		
<i>t</i> ^b	0,62			2,65		
<i>Precisión</i>						
<i>Repetibilidad</i>						
Número de muestras (<i>N</i>)	9			9		
Desviación estándar (%)	0,7			0,8		
<i>Precisión intermedia</i>						
Número de muestras (<i>N</i>)	3 × 9			3 × 9		
Suma de cuadrados (intra-día)	1,44			0,194		
Suma de cuadrados (entre días)	9,04			13,0		
<i>F</i> ^c	1,90			0,181		
Recuperación media entre días (%)	100,3	100,7	100,2	99,2	99,4	99,3
Recuperación media total (%)	100,4			99,3		
RSD intra-día (%)	0,72			0,10		
RSD entre días (%)	0,38			0,54		

$${}^b t = \frac{\bar{X}_N - \mu}{(S_N / N)^{0,5}} ; t_{crit(0,01, 8)} = 2,90 ; {}^c F_{crit(0,05, 2, 24)} = 3,40$$

III.3.4. Diseño del Conjunto de Calibración, Optimización de Parámetros Estadísticos de la Calibración y Validación del Método DRE

Para el desarrollo y validación del método analítico propuesto para HCT y PRO, basado en DRE, se optimizaron inicialmente las distintas variables que hacen al desempeño

apropiado del modelo.

En primer lugar, se efectuó la selección de la longitud de onda de cuantificación, lo cual se llevó a cabo mediante un algoritmo desarrollado *ad hoc* que calculó la recuperación de un grupo de mezclas en función de la λ de medida y en base a los datos proporcionados por el espectro de absorción de ambos analitos. Este algoritmo en combinación con ensayos de prueba y error contribuyó a seleccionar la concentración del espectro divisor en cada caso. En la Figura III.3.4 se pueden observar los espectros DRE correspondientes a las soluciones de la curva de calibración de HCT; de los mismos se desprende que la longitud de onda de elección para la cuantificación de HCT es 276 nm, coincidiendo esta elección con la propuesta del mencionado algoritmo.

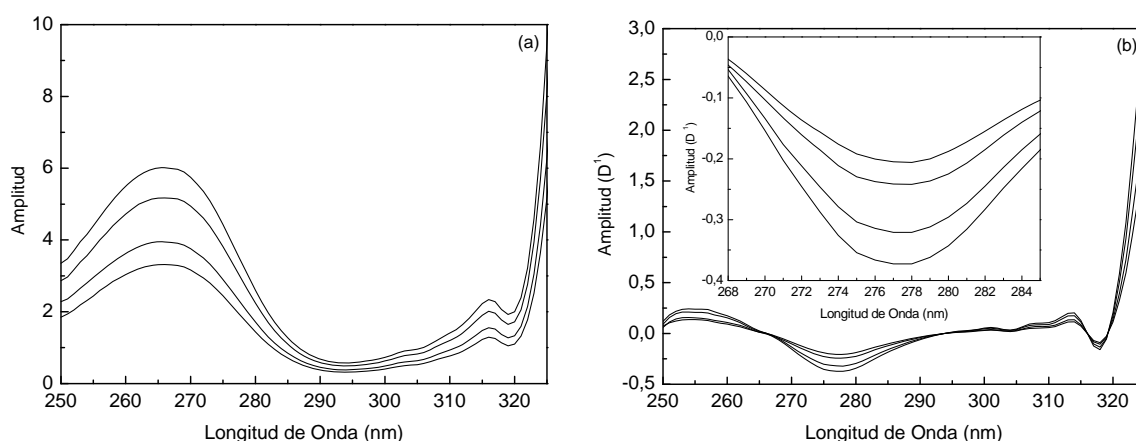


Figura III.3.4. Espectros cociente (a) y DRE (b) correspondientes a las soluciones de la curva de calibración de HCT (8,7, 10,4, 13,9 y 16,0 mg L⁻¹; espectro divisor: PRO, 14,0 mg L⁻¹).

En base a dicho algoritmo también pudo determinarse que PRO podría ser cuantificado a 288, 307, 312 o 322 nm, como se puede observar en la Figura III.3.5, ya que se obtienen excelentes recuperaciones y la contribución de HCT es mínima en las mismas; sin embargo, un análisis de las rectas de calibración indicó que determinando el analito a 322 nm, el método resulta ser satisfactoriamente sensible y proporciona resultados más consistentes. A continuación, las condiciones para llevar a cabo el procedimiento de DRE fueron

optimizadas.¹⁷⁶ Entre las diversas opciones estudiadas para aplicar el algoritmo de Savitzky-Golay, pudo observarse que los mejores resultados se obtuvieron para ambos analitos empleado una ventana de suavizado de nueve puntos.

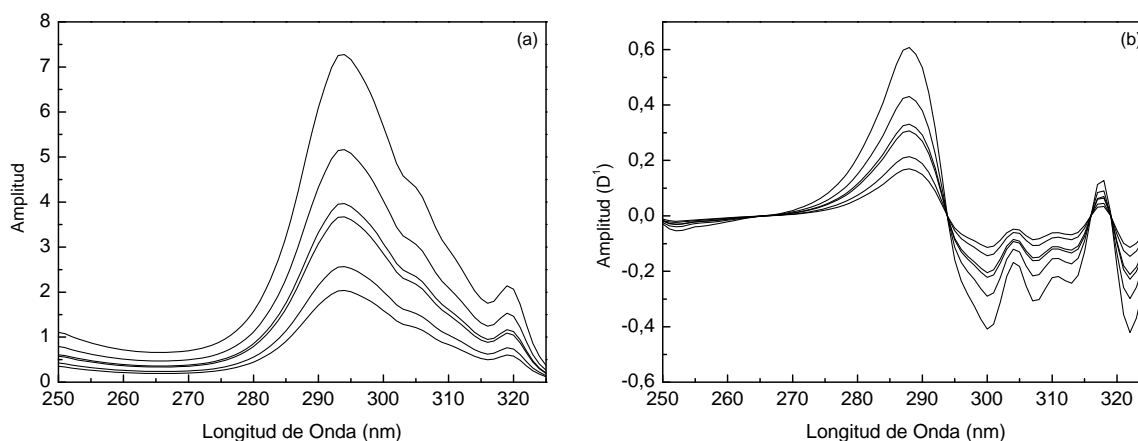


Figura III.3.5. Espectros cociente (a) y DRE (b) correspondientes a las soluciones de la curva de calibración de PRO. (14,0, 17,9, 25,8, 28,0, 36,0 y 51,5 mg L⁻¹; espectro divisor: HCT, 13,9 mg L⁻¹).

El método optimizado fue validado interpretando, por una parte, las cifras de mérito de la calibración y la calidad de las rectas de calibración, que se consignan en la Tabla III.3.3. Se observó que las rectas de calibración obtenidas para ambos analitos contemplaron el paso por el origen del sistema de coordenadas, presentando valores de r^2 superiores a 0,99, lo cual fue indicativo de su calidad y se consideró satisfactorio. Por otra parte, los valores de LOQ calculados para ambos analitos permitieron confirmar que el intervalo de trabajo propuesto se encuentra por encima del nivel mínimo de cuantificación. Estos resultados se consideraron satisfactorios a los fines de la calibración.

La exactitud y precisión del método DRE fueron determinadas mediante una validación externa, por la evaluación de un grupo de 9 muestras conteniendo diferentes niveles de concentración de ambos analitos dentro de sus respectivos intervalos lineales, donde las recuperaciones no fueron estadísticamente significativas al 100% para ambos analitos.

Tabla III.3.3. Parámetros de calibración del modelo DRE para HCT y PRO.

Parámetro de interés	HCT	PRO
Longitud de onda de trabajo (nm)	276	322
Intervalo lineal (mg L ⁻¹)	8,7 – 16,0	14,0 – 51,5
Niveles de concentración de la recta (mg L ⁻¹)	8,7 – 10,4 – 13,9 – 16,0	14,0 – 17,9 – 25,8 28,0 – 36,0 – 51,5
Concentración del espectro divisor (mg L ⁻¹)	14,0 (PRO)	13,9 (HCT)
Número de puntos de suavizado	9	9
Ordenada al origen ($y_0 \pm SD$)	$-(1,8 \pm 5,9) \times 10^{-3}$	$(4,2 \pm 8,6) \times 10^{-4}$
Pendiente ($k \pm SD$)	$-(22,6 \pm 0,5) \times 10^{-3}$	$-(8,21 \pm 0,03) \times 10^{-3}$
r^2	0,9996	0,9999
Límite de detección (mg L ⁻¹)	0,4	0,9
Límite de cuantificación (mg L ⁻¹)	1,2	3,2

Se realizó una regresión lineal entre los tenores de analitos recuperados frente a los correspondientes valores reales, observándose que los parámetros de la recta de regresión obtenida cumplen con la prueba de la elipse de confianza conjunta (la elipse contiene el punto ordenada al origen igual a 0 y la pendiente igual 1) para ambos analitos y los coeficientes de correlación de dichas rectas fueron 0,9981 y 0,9999 para HCT y PRO, respectivamente. Por otra parte, se observó que los residuos de las concentraciones aparecen distribuidos al azar en torno al cero.

III.3.5. Aplicación de los Métodos Propuestos

Con los tres métodos analíticos validados se procedió a analizar los comprimidos de la única marca comercial disponible, en sus dos formulaciones disponibles. Se realizaron los ensayos de control de dosis y disolución y se construyeron los correspondientes perfiles de disolución.

III.3.5.1. Control de dosis de productos farmacéuticos

El uso de los tres métodos propuestos permitió obtener resultados del tenor de los principios activos dentro de los límites habitualmente consignados oficialmente como aceptables (90 – 110% de lo rotulado). Los resultados fueron comparados con los obtenidos mediante la aplicación del método CLAE, oficial de la USP 30 para cada uno de los principios activos, variando ligeramente las condiciones cromatográficas para disminuir el tiempo del ensayo.⁶⁰ La metodología propuesta también se comparó con un método de la literatura basado en espectroscopia de derivadas.¹⁷⁰

Los resultados de recuperación por los métodos DRE, USP 30 y UV-PLS para los dos principios activos pueden observarse en la Tabla III.3.4.

Tabla III.3.4. Determinación simultánea de HCT y PRO en muestras sintéticas y comprimidos comerciales (control de dosis) mediante los métodos UV-PLS, UV-PCR, DRE, USP 30 y una metodología de la literatura.

Muestras	Analito	Método de la literatura ¹⁷⁰	UV-PLS/ UV-PCR	DRE	USP 30
Mezcla Sintética	HCT	102,8 ± 2,3	100,1 ± 0,7	100,1 ± 1,4	
	PRO	94,5 ± 1,8	99,3 ± 0,8	100,3 ± 1,0	
Control de dosis 25mg HCT/40mg PRO	HCT	96,5 ± 1,3	94,7 ± 1,5	94,2 ± 0,9	95,8 ± 1,6
	$t_{\text{calculado}}^a$	0,83	1,30	2,13	
Control de dosis 25mg HCT/80mg PRO	PRO	90,9 ± 1,7	95,0 ± 0,7	94,0 ± 0,8	94,3 ± 1,8
	$t_{\text{calculado}}^a$	3,36	0,88	0,37	
	HCT	99,8 ± 1,3	98,5 ± 0,7	97,4 ± 0,9	
	PRO	96,1 ± 0,6	101,3 ± 0,4	100,4 ± 0,4	

^a $t_{\text{crit}(0,005, 10)} = 3,17$.

Con la aplicación de la prueba t se concluyó que no existe diferencia significativa en el porcentaje de recuperación por los métodos UV-PLS, UV-PCR, DRE y CLAE (USP 30)⁶⁰ para la valoración de los comprimidos, evidenciándose una notable diferencia con el método de derivadas de la literatura.¹⁷⁰

III.3.5.2. Ensayo de disolución de productos farmacéuticos conteniendo HCT y PRO

Teniendo en cuenta que se trata de una asociación farmacológica oficial de la USP 30,⁶⁰ el ensayo de disolución se llevó a cabo en las condiciones prescritas por dicha farmacopea (Aparato I de la USP, 100 rpm, a $37,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, con 900 mL de HCl 0,01 M) y las determinaciones analíticas correspondientes fueron realizadas por los diversos métodos, que incluyeron DRE, UV-PLS, UV-PCR, el método espectrofotométrico de la USP 30,⁶⁰ consistente en una extracción selectiva con hexano como solvente y un método espectrofotométrico de derivadas de la literatura.¹⁷⁰

Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla III.3.5, donde se muestra que los métodos propuestos produjeron resultados estadísticamente equivalentes a los provistos por la metodología oficial ($p < 0,05$), con las ventajas adicionales de consumir menos tiempo y emplear menos solventes contaminantes.

Tabla III.3.5. Ensayo de disolución de comprimidos comerciales de HCT y PRO. Determinación simultánea de los analitos mediante los métodos UV-PLS, UV-PCR, DRE, USP 30 y una metodología de la literatura.

Muestras	Analito	Método de la literatura ¹⁷⁰	UV-PLS/ UV-PCR	DRE	USP 30 ^a
Ensayo de disolución	HCT ^a	$96,0 \pm 1,4$	$92,7 \pm 1,3$	$94,7 \pm 1,8$	$94,5 \pm 1,5$
25mg HCT/40mg PRO	$t_{\text{calculado}}$	1,79	2,22	0,20	
	PRO ^a	$91,4 \pm 2,0$	$95,3 \pm 1,4$	$96,9 \pm 1,9$	$97,6 \pm 2,5$
	$t_{\text{calculado}}$	4,74	1,96	0,54	
Ensayo de Disolución	HCT ^a	$97,6 \pm 4,3$	$98,2 \pm 2,5$	$98,8 \pm 3,0$	$98,8 \pm 2,6$
25mg HCT/80mg PRO	$t_{\text{calculado}}$	0,58	0,40	0,00	
	PRO ^a	$93,3 \pm 3,4$	$101,2 \pm 3,7$	$101,2 \pm 3,8$	$102,9 \pm 3,4$
	$t_{\text{calculado}}$	4,89	0,83	0,82	

^a Los resultados se expresan en relación a lo declarado en el rótulo en recuperación (%) , para seis muestras; $t_{\text{crit}(0,005, 10)} = 3,17$.

III.3.5.3. Preparación de perfiles de disolución

Los perfiles de disolución fueron obtenidos a partir de seis comprimidos sometidos a análisis en un equipo de disolución de acuerdo con las condiciones de la USP 30.⁶⁰ Los gráficos correspondientes a los perfiles resultantes de aplicar los métodos DRE y UV-PLS se muestran en la Figura III.3.6, donde puede observarse la congruencia de los resultados proporcionados por ambos.

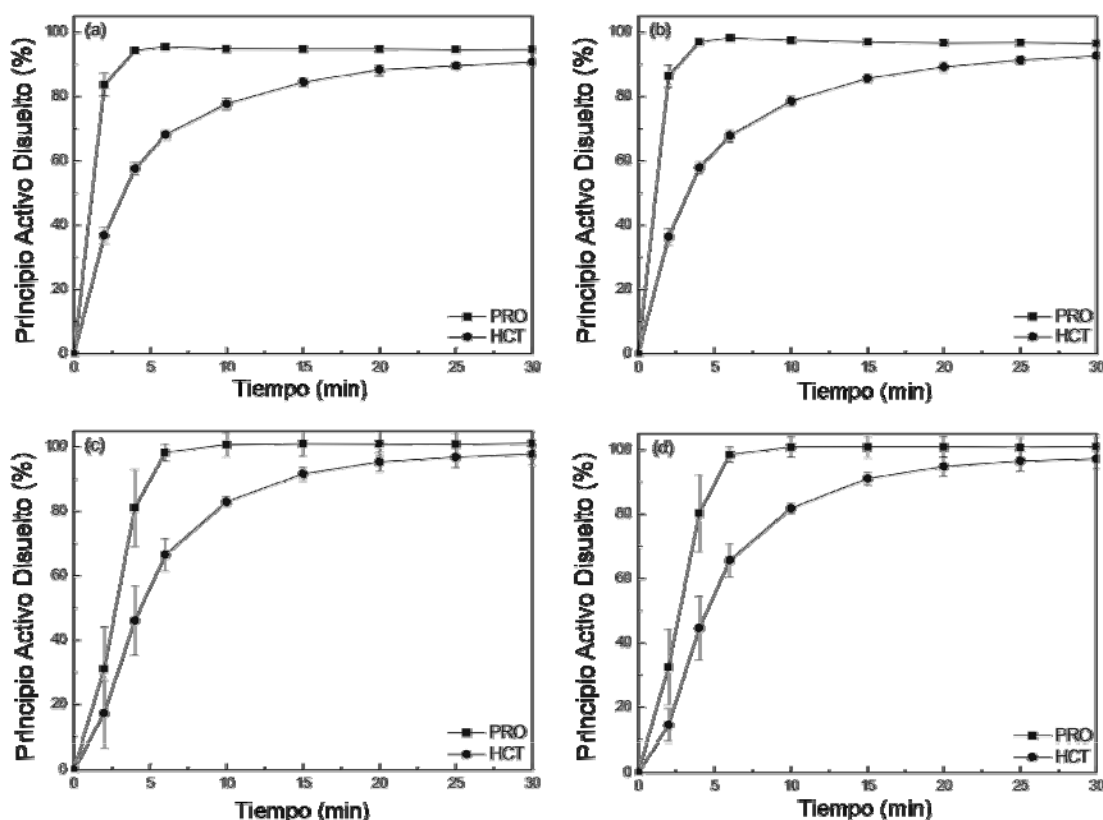


Figura III.3.6. Arriba: Perfiles de disolución de comprimidos conteniendo 25 mg HCT y 40 mg PRO, determinados por los métodos UV-PLS (a) y DRE (b). Abajo: Perfiles de disolución de comprimidos conteniendo 25 mg HCT y 80 mg PRO, determinados por los métodos UV-PLS (c) y DRE (d).

III.3.6. Conclusiones

Se desarrollaron tres métodos analíticos (UV-PLS, UV-PCR y DRE) útiles para la determinación simultánea de HCT y PRO en muestras tanto sintéticas como reales correspondientes a formulaciones comerciales conteniendo 25 mg HCT y dos cantidades

diferentes de PRO (40 u 80 mg).

Los métodos propuestos fueron validados, demostrando ser lineales en el intervalo de trabajo, como así también exactos, precisos y reproducibles. La utilidad de los mismos se demostró cuando éstos se aplicaron a los ensayos de control de dosis y disolución; además los mismos fueron exitosamente utilizados para la construcción de perfiles de disolución de los comprimidos de esta asociación farmacológica.

UV-PLS y UV-PCR proporcionaron resultados muy similares tanto durante la validación como frente a muestras reales en ensayos de control de calidad de los productos formulados.

La aplicación de las metodologías DRE, UV-PLS y UV-PCR permitió obtener resultados estadísticamente comparables con los logrados mediante el uso de los procedimientos oficiales de la USP 30,⁶⁰ demostrándose que uno de los métodos espectrofotométricos de derivadas previamente reportado no reuniría los requisitos de similitud estadística tanto con la metodología oficial como con los métodos propuestos.

Frente a la necesidad de optar por una metodología analítica, de los tres nuevos métodos propuestos DRE sería el más favorecido, por ser matemáticamente más sencillo y necesitar menor cantidad de soluciones de calibración.

Por otra parte cabe destacar que en todos los casos los métodos propuestos resultaron ser más rápidos y ambientalmente más amigables que las separaciones cromatográficas o las extracciones con solventes, requeridos por la analítica farmacéutica oficial.

III.4. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE HIDROCLOROTIAZIDA Y LOSARTÁN POTÁSICO EN MEZCLAS BINARIAS MEDIANTE ANÁLISIS MULTIVARIADO. COMPARACIÓN CON CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA

III.4.1. El Problema Analítico

Losartán Potásico (LST) es un antagonista no-peptídico de los receptores de Angiotensina II, que actúa principalmente bloqueando los receptores AT1 y reduciendo el efecto vasopresor de la Angiotensina. Al combinarse con un diurético de la familia de las tiazidas como la Hidroclorotiazida (HCT) con capacidad para inhibir los canales transportadores de potasio se logra una útil asociación farmacológica, muy empleada en la terapia antihipertensiva actual.¹²⁰ Las especialidades farmacéuticas que contienen estos principios activos los presentan en una relación de masas 4:1 (LST-HCT, respectivamente).

Aunque esta asociación medicamentosa se encuentra ampliamente disponible en el mercado, no es oficial en ninguna Farmacopea; sin embargo, la USP 30⁶⁰ y la EP¹⁷⁷ poseen monografías que contienen métodos útiles únicamente para la cuantificación de HCT. Por otra parte, LST es uno de los pocos principios activos que se sintetizan en el país.

En tiempos recientes, esta combinación farmacológica ha sido sujeto de intensa actividad de investigación analítica y varios métodos se han reportado para la determinación simultánea de sus componentes, incluyendo HPTLC,¹⁷⁸ SCFC,¹⁷⁹ electroforesis capilar,¹⁸⁰ electrocromatografía capilar¹⁸¹ y CLAE.¹⁸² En fluidos biológicos, los principios activos han sido determinados en forma simultánea mediante GC-MS.¹⁸³

Estos métodos no siempre son sencillos de ser llevados a cabo y también consumen mucho tiempo, requieren una cuidadosa y muchas veces tediosa preparación de la muestra, debido a las diferentes características de ambos analitos, o hacen uso de instrumentos sofisticados y de elevado costo y complejidad, los cuales no siempre se encuentran disponibles en todos los laboratorios de control de calidad.

Siendo simples, económicos y rápidos, los métodos analíticos espectrofotométricos constituyen una alternativa muy conveniente para el análisis de principios activos en sus formulaciones farmacéuticas. Sin embargo, sólo un puñado de estos métodos ha sido reportado en relación con la determinación de la asociación HCT-LST. Estos incluyen espectroscopia a dos longitudes de onda (206,6/270,6 nm o 236/270 nm),¹⁸⁴ espectroscopia dual ($A_{261,4} - A_{206,6}$),¹⁸⁵ determinaciones de área bajo la curva espectral,¹⁸⁶ espectroscopia de primera¹⁷⁸ y cuarta derivada,¹⁸⁷ como así también técnicas de DRE y de compensación,¹⁶⁵ todas las cuales presentan diferentes y en algunos casos importantes deficiencias. Dichas deficiencias incluyen la presencia de una relación señal/ruido inconveniente, rango lineal inapropiado para la construcción de perfiles de disolución, pobre robustez, la necesidad de espectros de alta resolución ($< 0,1$ nm) cuidadosamente tomados, el uso de muestras muy concentradas y la elevada susceptibilidad de los métodos a dar resultados erróneos frente a potenciales interferencias por parte de excipientes, que absorben a bajas longitudes de onda.

Dos grupos de investigadores emplearon métodos quimiométricos previamente con el objeto de resolver esta mezcla. En un caso, ello tuvo lugar en conjunción con métodos cromatográficos,¹⁸⁸ mientras que el otro grupo informó la aplicación de redes neuronales artificiales sobre datos espectrofotométricos de mezclas de los analitos; sin embargo, la conjugación de métodos elegida en este último caso no parece ser la más apropiada para el problema propuesto en términos de simplicidad, especialmente debido a la naturaleza lineal del mismo.¹⁸⁹

Por ello, se levantaron los espectros de ambos compuestos por separado y en la relación terapéutica en la zona de 220–360 nm; sus correspondientes absorciones electrónicas se muestran en la Figura III.4.1. En la misma se observó que ambos principios activos absorben en el intervalo 220–290 nm y poseen coeficientes de extinción molar del mismo orden, por lo cual resulta extremadamente difícil cuantificar ambos de forma exacta y precisa en dicho

intervalo por medio de metodologías univariadas. A longitudes de onda mayores, la absorción de LST es mínima, mientras que la absorción de HCT es demasiado pobre como para poder desarrollar un método suficientemente sensible para dicho cometido. Por ello, estas diferencias espectrales resultan de poca utilidad para la determinación de HCT en el intervalo de concentraciones requerido.

Estas características de ambos espectros explican también los inconvenientes a los que se enfrenta el analista en la determinación espectroscópica simultánea de ambos analitos, dificultades que diferentes autores han procurado soslayar empleando diversas técnicas que incluyeron la espectrofotometría de derivadas en diferentes modalidades, sin que ello estuviera exento de inconvenientes.^{165,178,187}

Por ello, se conjeturó que el problema de cuantificación podría ser resuelto mediante la aplicación de algoritmo PLS en la región espectral comprendida entre 220 y 290 nm. Si bien esta región presenta un amplio solapamiento espectral entre ambos analitos, en ella los coeficientes de extinción molar observados hacen presuponer una buena sensibilidad una vez desarrollado el método.

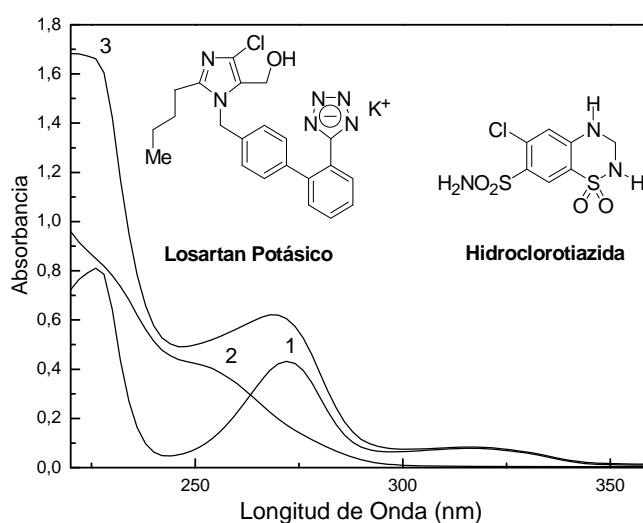


Figura III.4.1. Espectros de excitación electrónica, entre 220 y 360 nm, de HCT a $6,35 \text{ mg L}^{-1}$ (1); LST a $25,2 \text{ mg L}^{-1}$ (2) y una mezcla de HCT a $6,35 \text{ mg L}^{-1}$ y LST $25,2 \text{ mg L}^{-1}$, en agua destilada (3).

Para poder desarrollar un nuevo método analítico capaz de permitir la determinación simultánea de ambos principios activos sin que ello requiriese separación previa de los mismos o diluciones especiales de la muestra para cada analito, y utilizando el mismo método para ambos principios activos, se planificó llevar a cabo las siguientes actividades:

- Desarrollar, optimizar y validar un método multivariado UV-PLS para cuantificar ambos analitos en la mezcla.
- Evaluar la aptitud del método UV-PLS en relación con métodos cromatográficos disponibles en la literatura, basados en CLAE.
- Aplicar el desarrollo efectuado al control de calidad de muestras reales de productos comerciales de interés farmacéutico.

III.4.2. Diseño del Conjunto de Calibración. Optimización de Parámetros Estadísticos de la Calibración

Teniendo en vista como objetivo principal del desarrollo al ensayo cuantitativo de los principios activos presentes en el comprimido, aunque sin dejar de lado la posibilidad de hacer extensivo el uso de la herramienta analítica al ensayo de disolución y a la construcción de los perfiles de disolución de ambos componentes de la asociación farmacéutica estudiada, se trabajó de modo paralelo con dos conjuntos de calibración.

Para llevar a cabo la determinación de los principios activos se empleó un conjunto de calibración de tipo factorial completo de cuatro niveles (4^2). El mismo fue diseñado en un intervalo de concentraciones acotado a los valores esperados para un ensayo de control de dosis, donde las absorbancias de los analitos fueran tales que las cifras de mérito del modelo resultaran óptimas para el fin propuesto.

Por otra parte, se suplementó el sistema de calibración anterior con un conjunto de muestras para otorgar al mismo la posibilidad de efectuar predicciones correctas en un intervalo de concentraciones más amplio, que incluyó las bajas concentraciones de los

analitos, propias de los primeros tiempos de la disolución de los comprimidos.

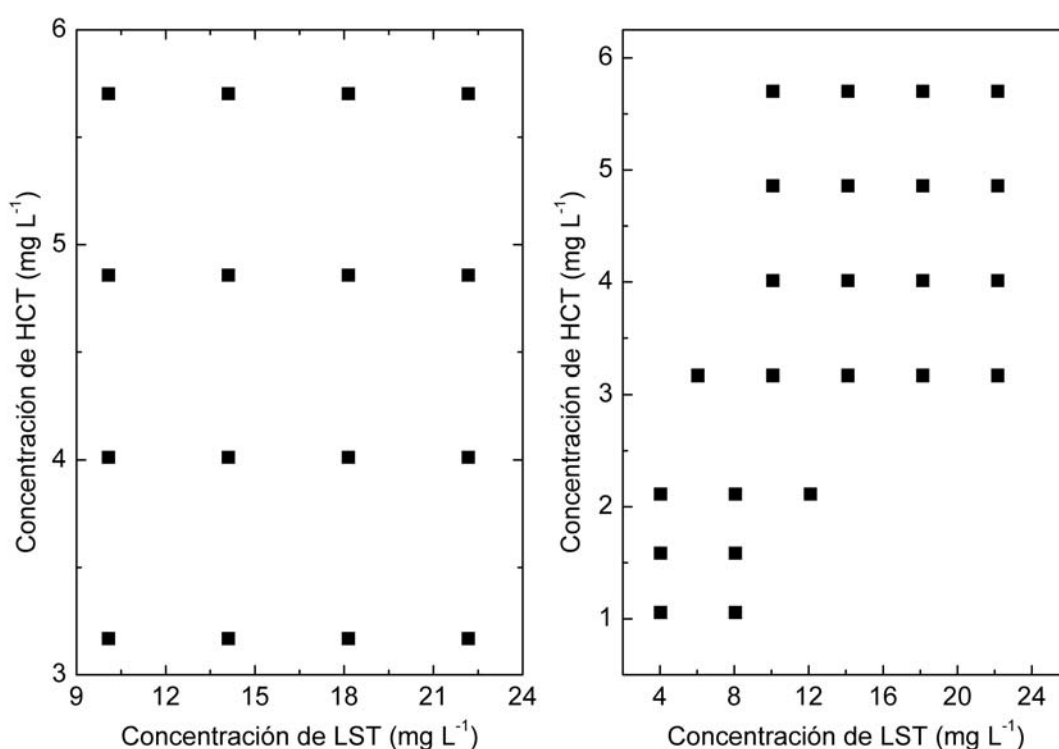


Figura III.4.2. Diseño de las mezclas de HCT y LST en los conjuntos de calibración, según sus propósitos. Izquierda: Diseño simétrico factorial completo 4^2 utilizado para el ensayo de control de dosis. Derecha: Diseño asimétrico empleado para la elaboración de perfiles de disolución.

El uso de este tipo de diseño a medida tiene varios precedentes en la literatura.^{63,103,190}

El mismo, que en cierto modo se recuerda a un diseño factorial no simétrico trunco,¹⁹¹ impone restricciones a las relaciones posibles entre analitos y evita modelar combinaciones inconcebibles de dichas concentraciones, del mismo modo que algunos modelos evitan modelar zonas “inaccesibles”.¹⁹² La disposición de las concentraciones de ambos analitos en las mezclas de calibración se detallan en la Figura III.4.2. El desempeño de este sistema resultó superior al de un diseño factorial completo de cinco niveles (5^2) o a un factorial completo asimétrico de 6×4 niveles.

En estas condiciones se encontró que, para los dos propósitos analíticos (valoración y disolución), el número óptimo de variables latentes (LVs) requerido fue de 2 para ambos

analitos y el intervalo de mejor recuperación fue 220–274 nm en ambos casos. Los detalles de la calibración, incluyendo cifras de mérito,⁶² se informan en la Tabla III.4.1.

Tabla III.4.1. Análisis UV-PLS de la mezcla Losartán-Hidroclorotiazida. Parámetros críticos de la calibración.

Parámetro	Valoración		Disolución	
	HCT	LST	HCT	LST
Nº de muestras de calibración (<i>N</i>)	16	16	24	24
Rango de concentración (mg L ⁻¹)	3,17 – 5,70	10,08 – 20,18	1,06 – 5,70	3,95 – 22,18
Intervalo espectral (nm)	220 – 274	220 – 274	220 – 274	220 – 274
Nº de variables latentes (LVs)	2	2	2	2
PRESS (mg L ⁻¹) ²	0,04	0,20	0,04	0,24
RMSD (%)	1,1	0,7	1,2	1,0
REC (%)	1,1	1,1	1,2	1,8
<i>r</i> ²	0,9978	0,9996	0,9993	0,9997
Selectividad (SEL)	0,50	0,50	0,22	0,42
Sensibilidad (SEN)	0,23	0,14	0,24	0,14
LOD (mg L ⁻¹)	0,17	0,28	0,07	0,16
LOQ (mg L ⁻¹)	0,57	0,94	0,23	0,53

Para la búsqueda del intervalo óptimo de sensores (Figura III.4.3) se empleó el algoritmo de selección de ventana móvil de ancho variable¹¹² utilizando el criterio de mínimo PRESS en conjunción con la prueba *F* propuesta por Haaland y Thomas, para evitar un posible sobre-ajuste.¹⁰⁵

Del análisis de las cifras de mérito de la Tabla III.4.1, se desprende que ambos modelos son idóneos para sus cometidos, siendo sus estimadores de dispersión de baja magnitud y similares entre los calibradores. Las únicas diferencias significativas que se pueden observar son la mejora del LOQ para el calibrador de 24 mezclas, la cual viene aparejada con el aumento del intervalo de concentraciones de calibración. Por otro lado, el calibrador factorial completo evidenció poseer una mayor selectividad para ambos analitos, la cual se fundamenta

en la mayor concentración promedio de sus soluciones, lo que aumentaría la relación señal/ruido de los espectros de calibración.

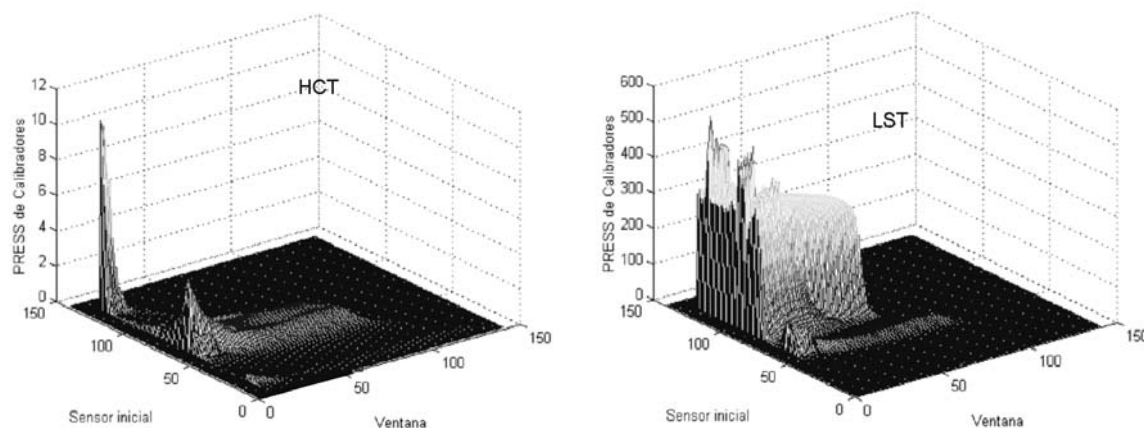


Figura III.4.3. Superficies de respuesta que representan el valor de PREES en función del sensor inicial y el ancho de la ventana móvil para la calibración de HCT (izquierda) y LST (derecha).

III.4.3. Validación del Método Mediante el Uso de Muestras Sintéticas

La exactitud y la precisión del método propuesto fueron evaluadas mediante actividades de validación externa, utilizando distintos grupos de muestras de validación independientes. La exactitud fue evaluada analizando la recuperación porcentual de los analitos en un grupo de mezclas sintéticas independientes y calculando los parámetros de las rectas de la regresión entre la concentración predicha de la muestra frente a los correspondientes valores reales. Los parámetros no resultaron ser significativamente diferentes de 0 para la ordenada al origen y 1 para la pendiente, al efectuarse el ensayo de la elipse de confianza conjunta;¹⁹³ se demostró además que el método no presenta errores sistemáticos ni sesgo en los resultados (Tabla III.4.2).

Para evaluar la precisión en el intervalo de concentraciones de interés se prepararon tres conjuntos de 9 mezclas sintéticas cada uno, cuyos resultados se evaluaron por medio de una prueba ANOVA a un factor. Se demostró que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos con un nivel de significación del 5% ($\alpha = 0,05$) para ninguno de

los dos analitos, como se detalla en la Tabla III.4.2.

Tabla III.4.2. Parámetros de la recta de concentración real versus concentración predicha y ANOVA para recuperaciones porcentuales de tres grupos de mezclas sintéticas.

Parámetro	HCT	LST
<i>Exactitud</i>		
Número de muestras (<i>N</i>)	9	9
Intervalo de concentración (mg L ⁻¹)	3,59 – 5,28	12,10 – 20,16
<i>a</i> ± SD (ordenada)	0,02 ± 0,13	0,18 ± 0,36
<i>b</i> ± SD (pendiente)	1,02 ± 0,03	0,99 ± 0,02
<i>r</i> ²	0,9944	0,9966
<i>Precisión</i>		
<i>Repetibilidad</i>		
RSD intra-día (%)	1,7	1,3
<i>Precisión intermedia</i>		
Número de muestras (<i>N</i>)	3 × 9	3 × 9
Suma de cuadrados (intra-día)	2,1737	0,2695
Suma de cuadrados (entre días)	40,73	30,044
<i>F</i> ^a	0,64	0,107
Recuperación media entre días (%)	99,1 – 99,3 – 98,6	100,3 – 100,2 – 100,4
Recuperación media total (%)	99,1	100,3
RSD entre días (%)	1,1	0,1

^a*F*_{crit (0,05, 2, 24)} = 3,40.

Por otra parte, se validó la robustez del método con respecto a las longitudes de onda inicial y final para el intervalo espectral de ambos analitos. Los resultados de este estudio se detallan en la Tabla III.4.3, donde las recuperaciones y sus correspondientes desviaciones estándar se ven expresadas con un número mayor de cifras significativas, que el pertinente,

sólo a fin de mostrar las exiguas variaciones observadas.

Tabla III.4.3. Validación de la robustez del método UV-PLS propuesto con respecto al sensor inicial y número de sensores empleados.^a

Intervalo Espectral (nm)	Nº de Sensores	Recuperación ± RSD (%)	
		HCT	LST
220 – 269	50	99,14 (1,28)	100,45 (1,16)
220 – 274	55	99,18 (1,23)	100,45 (1,11)
220 – 279	60	99,20 (1,21)	100,43 (1,08)
224 – 269	46	99,15 (1,23)	100,42 (1,16)
224 – 274	51	99,20 (1,19)	100,45 (1,11)
224 – 279	56	99,21 (1,19)	100,43 (1,09)
229 – 269	41	99,13 (1,21)	100,45 (1,13)
229 – 274	46	99,20 (1,20)	100,45 (1,13)
229 – 279	51	99,22 (1,21)	100,43 (1,09)
Recuperación media (± RSD)		99,18 (1,22)	100,44 (1,10)

^aLa prueba ANOVA dio HCT: $F_{\text{exp}} = 0,006$; LST: $F_{\text{exp}} = 0,001$; $F_{(0,01, 8, 72)} = 2,77$.

Al efectuar sendas pruebas ANOVA a un factor para ambos analitos, se concluyó que el método era robusto; es decir que pequeñas variaciones en la identidad del sensor inicial o el sensor final, y por ende en el número de sensores, no presenta efecto deletéreo sobre la calidad del resultado analítico provisto por el método.

III.4.4. Aplicación del Método Propuesto a Productos Farmacéuticos Comerciales

El método validado fue aplicado al análisis simultáneo de HCT y LST en especialidades farmacéuticas comerciales. Para garantizar un mayor grado de confiabilidad del método propuesto, también se procedió a comparar los resultados obtenidos con los arrojados por metodología cromatográfica extraída de la literatura.

Para la valoración de los comprimidos mediante el método UV-PLS, los mismos fueron

disueltos en un medio MeOH-H₂O para acelerar su extracción y asegurar una transferencia cuantitativa de los analitos a la solución que será empleada para su determinación.

Con el propósito de evaluar la robustez de dicho procedimiento se decidió llevar a cabo un ensayo en el cual se variaron las condiciones de agitación y el porcentaje de fase orgánica en el solvente de extracción siguiendo un diseño factorial completo asimétrico de 6×4 niveles. Efectuadas las correspondientes preparaciones de muestra, las mismas se analizaron empleando el método UV-PLS propuesto, arrojando los resultados para ambos analitos que se consignan en la Figura III.4.4. De ambas Figuras, resulta claro que ninguno de los factores (solvente y tiempo de extracción) modifica de manera significativa la recuperación del principio activo en el dominio experimental estudiado.

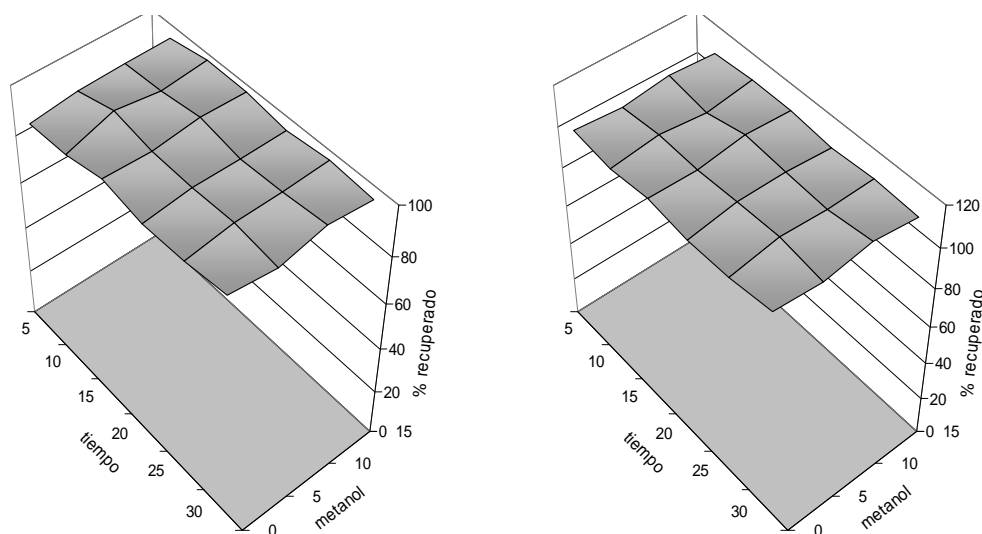


Figura III.4.4. Resultados del ensayo de robustez en la extracción para HCT (izquierda) y para LST (derecha).

En procura de obtener una mayor confianza estadística se realizó un análisis mediante superficie de respuesta¹⁹⁴ con los resultados obtenidos del experimento desarrollando un modelo cuadrático, donde F_1 y F_2 representan a los factores tiempo y porcentaje de MeOH en la mezcla de extracción respectivamente. El análisis estadístico del mismo permitió concluir que el único parámetro estadísticamente significativo de la Ecuación III.8, resulta ser el

término independiente (b_0) para ambos analitos. Con esta última información se concluyó que pequeñas variaciones en las condiciones de procesamiento de la muestra con el objeto de extraer los analitos no serían críticos para el proceso.

$$Y = b_0 + b_1 \times F_1 + b_2 \times F_1 + b_{11} \times F_1^2 + b_{22} \times F_2^2 + b_{12} \times F_1 \times F_2 \quad [\text{III.8}]$$

Para efectuar la comparación con CLAE, se implementaron las separaciones correspondientes. La Figura III.4.5 muestra un cromatograma típico de Losartán Potásico empleando una columna Erbasil C₁₈ (Carlo Erba) y una fase móvil compuesta de ACN-Solución reguladora de Fosfatos (0,1 M, pH= 4,0) en proporción 35:65 con un caudal de 1 mL/min.

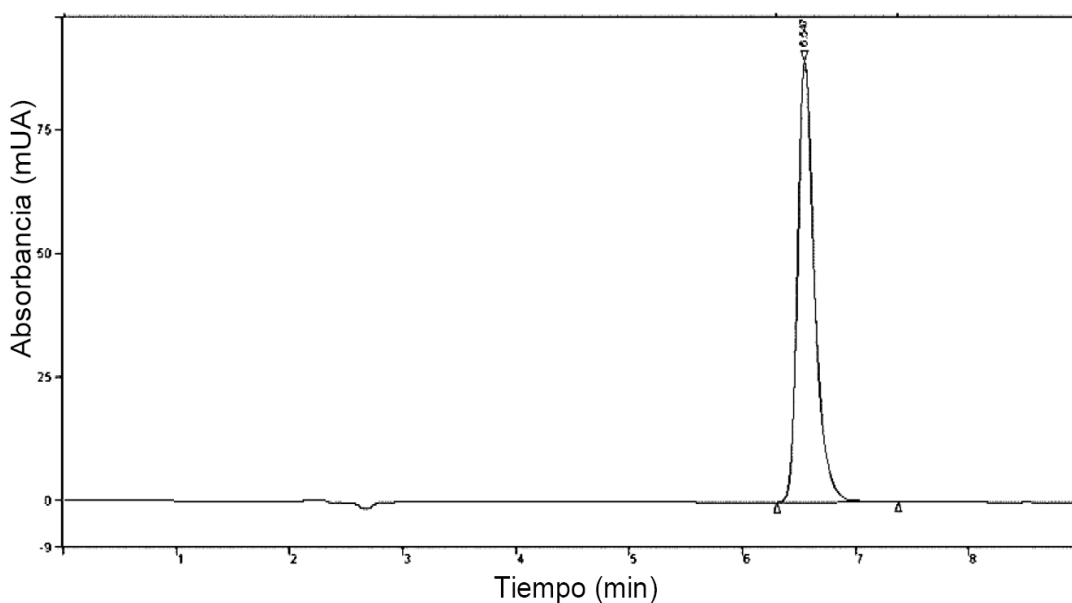


Figura III.4.5. Cromatograma típico de la curva de calibración de LST.

El intervalo de concentraciones de LST utilizado para la calibración fue 10,04–20,08 mg L⁻¹. La recta de regresión obtenida obedeció a la Ecuación III.9, donde AUC es el área bajo la curva cromatográfica del analito, cuya absorbancia se leyó a $\lambda = 230$ nm.

$$[\text{LST}] = (0,19 \pm 0,38) + (141,6 \pm 3,6) \times 10^{-8} \text{ AUC}; r^2 = 0,9948; N = 10 \quad [\text{III.9}]$$

Por su parte, la Figura III.4.6 muestra un cromatograma típico de HCT detectado a $\lambda = 230 \text{ nm}$ de las soluciones de la curva de calibración y empleando idénticas condiciones de corrida que para LST. El intervalo de concentraciones utilizado para la calibración de HCT fue $2,095\text{--}5,240 \text{ mg L}^{-1}$ y la recta obtenida se consigna en la Ecuación III.10.

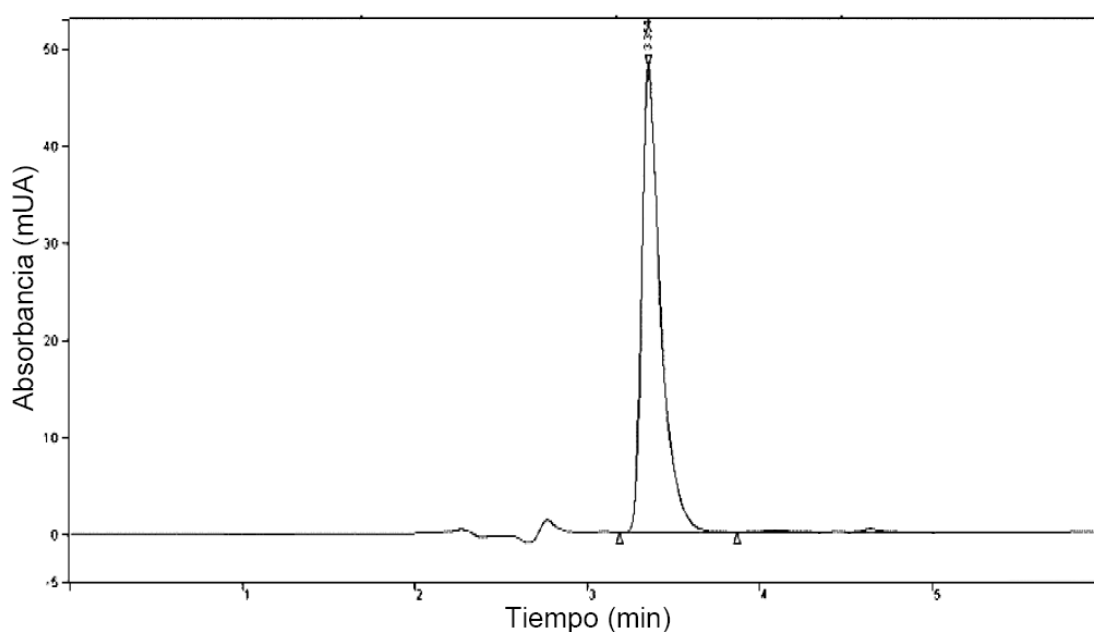


Figura III.4.6. Cromatograma típico de la cuantificación de HCT.

En las condiciones estudiadas, los tiempos de retención de HCT y LST fueron 3,4 y 6,5 min, respectivamente; sin embargo, la resolución adecuada de ambos principios activos en una misma corrida cromatográfica no fue posible ya que lograr que las concentraciones de los analitos entren en sus respectivos intervalos lineales hubiese requerido distintas diluciones para una misma muestra.

$$[\text{HCT}] = (-0,016 \pm 0,049) + (132,2 \pm 1,7) \times 10^{-8} \text{ AUC}; r^2 = 0,9986; N = 10 \quad [\text{III.10}]$$

La Tabla III.4.4 resume los resultados al emplear UV-PLS. Mediante la aplicación de la prueba t se concluyó que no existe diferencia significativa entre los resultados arrojados por el método de referencia y el nuevo método desarrollado, con un nivel de significación del 5%.

Tabla III.4.4. Determinación simultánea de HCT y LST en formulaciones comerciales mediante los métodos CLAE y UV-PLS.

Método	Parámetro	HCT	LST
UV-PLS ($N=6$)	Recuperación (%)	95,6	94,9
	RSD (%)	0,6	1,8
CLAE ($N=6$)	Recuperación (%)	94,4	95,2
	RSD (%)	1,4	1,3
	$t_{\text{calc}} [t_{(0,025, 10)} = 2,23]$	1,72	0,19

En otra de las aplicaciones demostrativas de su utilidad, el método validado fue empleado para construir los perfiles de disolución de HCT y LST en su formulación combinada (Figura III.4.7). Para tal fin, los modelos de calibración de HCT y LST fueron empleados para la determinación de ambos principios activos en muestras tomadas a intervalos pre-establecidos de los vasos del equipo de disolución. La disolución fue realizada en agua con el aparato configurado con paletas (Aparato II USP)⁶⁰ a una velocidad de rotación de 100 rpm, de acuerdo con la propuesta del grupo de Suhagia.¹⁹⁵ Resulta significativo, sin embargo, que el grupo de Lusina¹⁹⁶ también describió un ensayo de disolución para esta combinación, pero empleando HCl 0,1 M como el medio de disolución, en lugar de agua.

Una exigencia típica de la USP 30 es que al menos 80% de cada principio activo debe ser disuelto después de 30 minutos.⁶⁰ En las condiciones de prueba, los perfiles de disolución contruidos con la ayuda del método de UV-PLS revelaron que ambos analitos son disueltos a un grado mayor que el 80% después de 20 minutos, lo cual indica que los comprimidos analizados cumplirían con la exigencia oficial modelo.

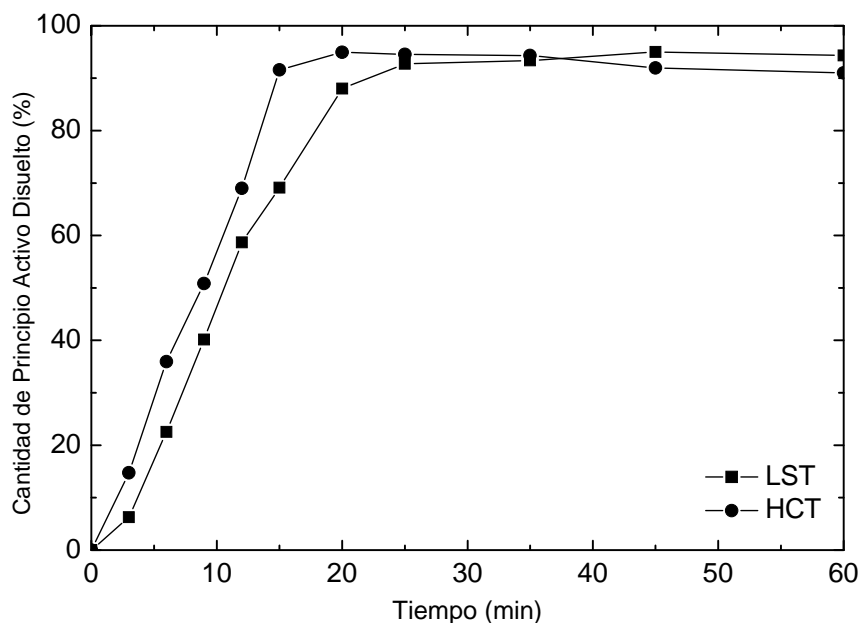


Figura III.4.7. Perfiles de disolución de HCT y LST obtenidos con la ayuda del método UV-PLS.

III.4.5. Conclusiones

Se desarrolló y validó un método conveniente para la determinación simultánea de Hidroclorotiazida y Losartán Potásico en muestras sintéticas binarias conteniendo ambos analitos y en comprimidos comerciales de esta formulación.

Este método estuvo basado en la aplicación de la metodología UV-PLS. La técnica desarrollada es simple, requiere instrumentación sencilla, el consumo de solventes es mínimo ya que se desarrolla esencialmente en agua y contiene un número de pasos menor a los métodos existentes, por lo que ahorra tiempo y esfuerzo. Además, la metodología propuesta es robusta con respecto al intervalo espectral empleado, presenta una buena repetibilidad y provee resultados con exactitud y precisión satisfactorias, en relación con los estándares típicos vigentes.

Su aptitud para la determinación simultánea de ambos analitos se verificó en el ensayo de dosis de muestras reales de comprimidos comerciales y los resultados obtenidos no presentaron diferencia significativa con los registrados por CLAE. El método propuesto

también se empleó con éxito para la construcción del perfil de disolución de ambos analitos presentes en una de las especialidades farmacéuticas comerciales.

III.5. UTILIZACIÓN DE METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES PARA DETERMINAR LA SIMILITUD DE PERFILES DE DISOLUCIÓN

III.5.1. El Problema Analítico

El ensayo de disolución es una herramienta *in vitro* simple y económica para asegurar la calidad de los productos formulados farmacéuticos sólidos que así lo requieren (comprimidos, cápsulas, etc.), en las diferentes etapas de su proceso de producción y durante su vida útil.⁴⁹

Su utilidad deviene del hecho que dicho ensayo es capaz de detectar la influencia de diversos factores, como tipo de excipientes, proceso de granulación, tipo de compresión y otros parámetros claves, en la liberación de los principios activos; de ese modo proporciona un control global del proceso y permite asegurar la consistencia entre lotes durante la fabricación de los productos formulados analizados.

Este ensayo también puede ser utilizado en la etapa de optimización de una formulación, o para comparar aspectos funcionales de distintas fórmulas o formulaciones de un mismo producto.¹⁹⁷ Debido a su correlación con la biodisponibilidad de los principios activos, en algunos casos estrictamente definidos, esta prueba ha sido aceptada como un reemplazo del ensayo de bioequivalencia, el cual requiere del empleo de seres vivos, resultando así mucho más complejo, costoso y difícil de implementar.¹⁹⁸

Puesto que resulta esencial investigar las características de liberación de los principios activos a partir de productos formulados, la disolución se ha convertido en un parámetro muy significativo y el ensayo de velocidad de disolución se ha transformado en uno de los ensayos oficiales de mayor importancia que se efectúa para asegurar que cápsulas, comprimidos y otras formas farmacéuticas sólidas cumplen con sus especificaciones pre-establecidas.

Para una formulación farmacéutica, la curva de la tasa promedio de la disolución en función del tiempo se conoce como su perfil de disolución. Existen varias situaciones en las cuales resulta crucial comparar perfiles de disolución de dos formas farmacéuticas sólidas

orales. Entre ellas, cuando ocurre la modificación de parámetros críticos de la manufactura, incluyendo el lugar de fabricación, la composición final del producto, el proceso productivo y el tamaño del lote producido, entre otros.

Las guías de la FDA para cambios de escala y modificaciones pos-aprobación para productos formulados sólidos requieren que los perfiles de disolución de los productos pre- y pos-cambio sean “similares”.¹⁹⁹ Las ideas y conceptos que fundamentan estas guías han sido adoptados por numerosos entes reguladores en todo el mundo, por lo que la similitud entre productos es un problema que se plantea en numerosos ámbitos y que deben resolver a menudo tanto autoridades regulatorias como fabricantes.

Otra situación paradigmática que requiere la determinación de similitud se presenta cuando se desarrollan preparaciones de medicamentos genéricos. En este caso, un producto propietario (ético), que ha estado en el mercado por un cierto tiempo y presenta seguridad y eficacia clínica comprobadas, se selecciona y designa como una referencia contra la cual comparar la nueva formulación. Esta es la estrategia adoptada por las autoridades regulatorias argentinas (ANMAT-INAME) para otorgar la aprobación final de todas las especialidades farmacéuticas de las que ya hay al menos un competidor en el mercado.

Como respuesta a la necesidad de determinar y demostrar la similitud entre perfiles de disolución han surgido varias estrategias de comparación, las mismas se pueden agrupar fundamentalmente en estrategias modelo-dependiente, modelo-independiente y basadas en pruebas ANOVA, cuyos fundamentos y metodologías más representativas fueron discutidos en la Sección I.3.1.5. De las estrategias nombradas, la más difundida, aunque no de aplicación general, es el cálculo de factores diferencia y similitud (f_1 y f_2 , respectivamente), cuyas fórmulas de cómputo se encuentran detalladas en las Ecuaciones III.11 y III.12, donde R y T representan las cantidades de analito disuelto en la referencia y la prueba, respectivamente, medidos a un número n de tiempos (t).

$$f_1 = 100 \times \left(\frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \right) \quad [\text{III.11}]$$

$$f_2 = 50 \times \log \left[\left(1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right)^{-0,5} \times 100 \right] \quad [\text{III.12}]$$

Estos indicadores presentan una serie de falencias e inconvenientes que alientan al desarrollo de metodologías alternativas. Entre los problemas detectados, ya discutidos en la literatura, el más importante es la falta de fundamento estadístico de los mismos.⁴⁸

Por lo anteriormente mencionado, se propuso llevar a cabo el desarrollo de un nuevo método de comparación de perfiles de disolución, basado en la estrategia de análisis de componentes principales. El desarrollo se llevó a cabo teniendo en cuenta las diferentes necesidades planteadas sobre aspectos de “similitud” y sobre la dinámica del proceso de disolución.

III.5.2. Diseño del Modelo y Optimización de Parámetros del Entrenamiento para PCA

PCA^{65b,200} es una técnica quimiométrica multivariada de reducción de la dimensionalidad de un conjunto de datos, basada en la descomposición de dichos datos, dispuestos en forma matricial, en valores singulares.

En este procedimiento, los componentes (en columnas) de la matriz dejan de tener correlación entre sí, lo cual significa que sus nuevos componentes están ubicados en vectores ortogonales pertenecientes a un nuevo espacio multidimensional.

Cuando se comenzó a trabajar con PCA surgieron varios interrogantes relacionados con la metodología propuesta y otros con la problemática planteada por la comparación de perfiles de disolución. En relación a los mismos, debieron establecerse criterios relativos al número de PCs necesario para representar correctamente el fenómeno de disolución, que se discute en la

Sección III.5.4.1.A , como así también la pertinencia de comparar más de dos lotes a la vez. Por otra parte se previó la necesidad de articular una estrategia para diferenciar entre los distintos grupos visualizados por PCA y decidir cómo comparar los resultados provistos por la técnica multivariada con el método de referencia f_2 (Sección III.5.4.1.B) .

El uso de una matriz única con el objeto de comparar datos de más de dos lotes, sean de una misma marca o de marcas diferentes, se descartó por el hecho de que la problemática de comparación entre perfiles de disolución sólo tiene efecto entre 2 lotes, entre el lote de referencia (ético o medicamento aprobado) y el lote de prueba (genérico o lote pos-cambio). Además, al comparar sólo dos lotes por vez, se aplica la misma filosofía de trabajo que se utiliza oficialmente. Por otro lado, si bien PCA permite la visualización de diferencias entre más de dos grupos presentes en un conjunto de datos, la presencia de un grupo adicional podría modificar la posición relativa de los grupos entre sí, por cambio en las proyecciones de los mismos, acercando o alejando los mismos en el nuevo espacio de PCs.

Si bien existen distintos métodos multivariados para diferenciar y/o clasificar los grupos presentes en un conjunto (Sección I.5.1), la utilización de la Distancia de Mahalanobis (MD)²⁰¹ resultó ser la más apropiada para abordar el problema de la disolución. Esta decisión se fundamentó en que MD posee una base estadística sólida y permite realizar una representación gráfica de la región de confianza, lo cual posibilita una rápida y fácil toma de decisión.

Las regiones de confianza multivariadas basadas en la MD son una herramienta útil para poder comparar vectores de datos. Una propiedad muy importante de la MD a los fines de la clasificación es que ésta representa la distancia vectorial ponderada por la covariancia de los datos, S_{XX} ; la misma presenta la distribución estadística de una χ^2 (Chi cuadrado) con r grados de libertad, donde r concuerda con la cantidad de PCs capaces de representar adecuadamente la muestra.

La Ecuación III.13 representa una elipse de confianza para dos componentes principales, que contiene los datos con una probabilidad de $1 - \alpha$. Los vectores w_1 y w_2 proveen información acerca de la orientación de la elipse, la longitud de cuyos ejes está definida por $(d_1 \chi^2_{1-\alpha, r})^{0,5}$ y $(d_2 \chi^2_{1-\alpha, r})^{0,5}$. El número de grados de libertad de χ^2 coincide con el número r de PCs seleccionadas. En la misma, d_1 y d_2 son los autovalores de la matriz \mathbf{S}_{XX} , y w_1 y w_2 son elementos de la matriz $w = \mathbf{B}(x - \mu_x)$, donde las filas de \mathbf{B} son los autovectores de \mathbf{S}_{XX} ,

$$P \left[\left(\frac{w_1^2}{d_1 \chi^2_{1-\alpha, r}} \right) + \left(\frac{w_2^2}{d_2 \chi^2_{1-\alpha, r}} \right) < 1 \right] = 1 - \alpha \quad \text{[III.13]}$$

En el caso de requerir tres PCs, se podría recurrir a la implementación de elipsoides en tres dimensiones, con volumen representativo de la probabilidad $1 - \alpha$. Por analogía con la Ecuación III.13, la Ecuación III.14 muestra la descripción matemática de los correspondientes elipsoides, donde w y d tienen el mismo significado que para las elipses. Para el caso de más de tres PCs, la representación gráfica se torna imposible, aunque la resolución analítica aún sería posible.

$$P \left[\left(\frac{w_1^2}{d_1 \chi^2_{1-\alpha, r}} \right) + \left(\frac{w_2^2}{d_2 \chi^2_{1-\alpha, r}} \right) + \left(\frac{w_3^2}{d_3 \chi^2_{1-\alpha, r}} \right) < 1 \right] = 1 - \alpha \quad \text{[III.14]}$$

El procedimiento propuesto para la comparación de perfiles de disolución, dadas las matrices \mathbf{A} ($q \times t$) y \mathbf{B} ($q \times t$), que contienen los perfiles de disolución de q comprimidos correspondientes a cada lote (\mathbf{A} y \mathbf{B} , respectivamente) a ensayar, con t puntos temporales tomados en cada caso, se basa fundamentalmente en las etapas que se detallan en la Tabla III.5.1.

Tabla III.5.1. Etapas del procedimiento propuesto para la comparación de perfiles de disolución

-
- Detectar datos discordantes (en inglés, *outliers*) dentro de cada conjunto de datos, empleando la prueba estadística de Hotelling.
 - Construir una matriz que contenga los datos de \mathbf{A} ($q \times t$) y \mathbf{B} ($q \times t$), llamada \mathbf{X} ($2q \times t$). Centrar en la media de cada columna los datos de \mathbf{X} para obtener \mathbf{X}_c ($2q \times t$), y sobre esta última llevar a cabo la descomposición en valores singulares (SVD), obteniéndose las matrices \mathbf{U} , \mathbf{S} y \mathbf{V} .
 - Seleccionar el número óptimo de PCs a ser utilizados para la clasificación.
 - Obtener la región de confianza multivariada del 95%, con el objeto de desarrollar un ensayo de hipótesis.
 - Tomar la decisión de “similitud”, en base a la inclusión de los puntos espaciales de los componentes principales de \mathbf{B} sobre la región de confianza de \mathbf{A} ($> 80\%$).
-

III.5.3. Datos de Perfiles de Disolución

Con el fin de evaluar el funcionamiento de la metodología propuesta, se analizaron datos de distinta procedencia, que permitieron plantear diferentes problemáticas. A los efectos de esta discusión, los mismos fueron agrupados en dos categorías, que incluyeron datos experimentales y datos de disolución provenientes de la literatura.

III.5.3.1. Datos Experimentales

III.5.3.1.A. Furosemida

Fueron estudiados ocho lotes de comprimidos que contienen 40 mg de FUR por unidad de dosis, correspondientes a tres marcas diferentes, designadas como A (lotes A_1 , A_2 y A_3), B (lotes B_1 , B_2 y B_3) y C (lotes C_1 y C_2). Se tomó la marca A como producto innovador.

III.5.3.1.B. Acetaminofeno

Tres marcas diferentes de comprimidos conteniendo 500 mg de acetaminofeno fueron estudiadas. La marca A fue usada como el producto innovador o de referencia. Las otras

marcas fueron designadas al azar como B y C para su identificación.

III.5.3.1.C. Datos provenientes de la literatura

Se emplearon datos tomados de las siguientes fuentes: (a) Tsong y Hammerstrom (1994),²⁰² consistentes en curvas de disolución de tres lotes aprobados y un nuevo lote de prueba (12 comprimidos cada uno, 7 puntos temporales por unidad); (b) Sha y col. (1998)²⁰³ y Ma y col. (2000),²⁰⁴ conteniendo datos de un lote de referencia pre-cambio y cinco lotes de ensayo post-cambio.

III.5.4. Análisis de los Perfiles. Comparación Entre Métodos Basados en f_1 y f_2 y PCA-CR

III.5.4.1. El método PCA-CR

El procedimiento propuesto para la evaluación de “similitud” mediante análisis PCA-CR de curvas de disolución, consta de cinco pasos, incluyendo: (a) la detección de datos discordantes en la muestra de referencia y en la muestra bajo ensayo; (b) construcción y centrado en columna de una única matriz de datos que contiene los datos de las muestras de referencia y de prueba, la cual luego es sometida a la operación SVD; (c) selección del número de PCs a ser conservados; (d) representación gráfica de los tantos ponderados (en inglés, *weighed scores*) para las muestras de referencia y las del lote de prueba, seguido de cálculo de la región de confianza del 95%, basada en la dispersión de los tantos ponderados del lote de referencia; (e) toma de la decisión con referencia a la “similitud”, basada en el número de muestras de prueba incluidas en la región de confianza calculada.

Esta secuencia de pasos constituye el medio lógico más apropiado para el pre-procesamiento, análisis y visualización de los datos de ambas muestras bajo comparación y una ruta conveniente para arribar a la etapa de toma de decisión final.

La prueba de Hotelling representa una estrategia útil para la detección de datos

discordantes, ayudando a evitar la inclusión de curvas de disolución con una excepcionalmente alta variación con respecto al grupo en general, lo cual podría distorsionar la distribución de datos en el gráfico de componentes principales así como la configuración de la elipse de confianza y, en consecuencia, la decisión final.

Por otra parte, PCA es un procedimiento matemático que permite la representación de un conjunto complejo de datos multivariados mediante un número reducido de PCs, que son variables nuevas y no correlacionadas entre sí, las cuales son combinaciones lineales de los datos originales. El método propuesto evita o minimiza la falta de ajuste al proyectar los datos de prueba en un modelo de datos de referencia pre-establecido, aunando los conjuntos de datos de referencia y prueba y aplicando la operación SVD sobre una única matriz, lo que permite la optimización de parámetros del sistema que conducen a una proyección mejorada de los datos del lote de prueba en el espacio del conjunto de datos de referencia. Esta estrategia representa una mejora sustancial con respecto a métodos anteriormente publicados, como el presentado por el grupo de Tsong.²⁰⁵

Al descartar elementos de baja variabilidad, PCA permite una mejor visualización de los datos y evidencia de tendencias ocultas al representar la información en un espacio de menos dimensiones. El algoritmo utilizado ordena los PCs según su capacidad de explicar la variabilidad de datos y en los ejemplos seleccionados comentados más abajo, se propone el gráfico de los tantos ponderados pertenecientes a los dos primeros componentes principales, ya que éstos son suficientes para permitir la reconstrucción satisfactoria de la matriz original de datos, según lo comentado *a posteriori* en la Sección III.5.4.1.B. Este enfoque es mucho más simple que el propuesto por el grupo de Tsong y col.,²⁰⁵ donde se emplean todos los PCs para la comparación.

Después de algunos experimentos de prueba y error, y teniendo en cuenta que la “similitud” es una propiedad del lote y no de los comprimidos individuales, para la toma de

decisión se adoptó el siguiente criterio: *El lote de prueba se considera como “similar” si el mismo posee más del 80% de sus comprimidos²¹¹ dentro de la región de confianza del 95% del lote de referencia.*

El requerimiento de un nivel del 80% es arbitrario, y se estableció luego de analizar diferentes alternativas, en conjunción con diversos niveles de confianza para la construcción de la elipse. En la práctica, este requisito equivale a contabilizar no menos de 10/12 valores correspondientes a otras tantas curvas de disolución de comprimidos del conjunto muestra dentro de la elipse de confianza del 95% de probabilidad generada en base a los datos de la referencia. Este valor de 80% permite tener en cuenta la variabilidad de los datos del conjunto muestra en relación con la elipse de confianza del 95%, mientras que la elipse propiamente dicha considera la variabilidad del conjunto de referencia a través de la variación de los valores de sus tantos ponderados, todo lo cual da una idea de la versatilidad del método en su conjunto, a pesar de la aparente complejidad del razonamiento subyacente.

Para evaluar la aptitud del método propuesto, curvas de disolución de comprimidos de FUR y acetaminofeno, sumados a los dos conjuntos de datos seleccionados de la literatura, fueron individualmente analizados según la metodología PCA-CR y comparados con la información proporcionada por los criterios f_1/f_2 .

Los resultados para cada conjunto de datos son comentados separadamente, debido a que representan problemáticas diferentes, lo que además permitirá lograr una mejor discusión de las ventajas y desventajas del método.

III.5.4.1.A. Selección del número óptimo de PCs para implementar PCA-CR

Un problema de importancia que se presentó en la implementación de PCA-CR, tanto en relación al uso de datos propios como cuando se emplearon datos de la literatura fue utilizar la información disponible haciendo uso de un número apropiado de PCs, lo cual

planteó la necesidad de establecer un criterio de selección del número de PCs a retener (r).

Puesto que los PCs son considerados en orden decreciente de variancia explicada, la variación en los datos puede ser convenientemente explicada por un número pequeño de los primeros PCs, los que resultan significativos en comparación con las variables remanentes (residuales), cuya información está dominada por el ruido. Así, la matriz original de datos centrados en la media \mathbf{Xc} ($2q \times t$) podría ser descompuesta en una matriz $\mathbf{X}^* \mathbf{c}$ ($2q \times t$), y una matriz \mathbf{E} ($2q \times t$) de residuos, según la Ecuación III.15; a su vez, la matriz \mathbf{Xc} podría ser reconstruida con r PCs a partir de la matriz $\mathbf{X}^* \mathbf{c}$, donde $r < t$, según la Ecuación III.16; las restricciones impuestas a r se detallan en la Ecuación III.17.

$$\mathbf{Xc} (2q \times t) = \mathbf{X}^* \mathbf{c} (2q \times t) + \mathbf{E} (2q \times t) \quad \text{[III.15]}$$

$$\mathbf{Xc} (2q \times t) \approx \mathbf{X}^* \mathbf{c} (2q \times t) = \mathbf{U} (2q \times r) * \mathbf{S} (r \times r) * \mathbf{V} (r \times t)' \quad \text{[III.16]}$$

$$r \leq 2q - 1 (p \leq t) \text{ y } r \leq t (p > t) \quad \text{[III.17]}$$

En principio, el número de componentes principales que deberían retenerse (r) podría obtenerse estableciendo un umbral mínimo de variancia explicada o analizando los residuos de modo tal que el error contenido en la matriz \mathbf{E} sea similar al ruido instrumental. En estas últimas condiciones, se determinó que dos PCs resultaban suficientes para reconstruir los conjuntos de datos originales en los cuatro casos estudiados.

III.5.4.1.B. Obtención de la región $f_2 \leq 50$

Esta región se obtuvo con fines meramente comparativos. En cada caso, el vector de datos \mathbf{a} ($1 \times t$) del perfil de disolución promedio del lote de referencia fue transformado sucesivamente en nuevos vectores \mathbf{d} ($1 \times t$) reemplazando algunos de sus componentes con datos artificiales conteniendo desviaciones con respecto al vector original, capaces de originar

valores de f_2 con respecto al perfil de referencia, cercanos a 50; este procedimiento normalmente se denomina *bootstrapping*.²⁰⁶

El procedimiento se repitió un cierto número de veces y en cada instancia se computaron tanto los valores de f_2 como los valores de las primeras PCs de la curva de disolución artificial. Se ajustó luego la curva $f_2=50$ (que incluye la región $f_2 \leq 50$) sobre el correspondiente gráfico de la relación PC_1 vs. PC_2 . Las relaciones entre las elipses de confianza y las elipses fruto del *bootstrapping* se discuten para cada producto ensayado. En términos generales, su diferencia estriba en los diferentes factores que determinan ambas elipses. La elipse de confianza adopta sus características de la distribución de los tantos ponderados de las curvas de disolución, mientras que la elipse resultante del *bootstrapping* es sensible a las mismas variables que afectan a f_2 .

III.5.4.2. Disolución de comprimidos de Furosemida. Comparación de perfiles entre y dentro de las marcas

Los promedios de los porcentajes de principio activo liberado durante un período de 30 minutos por los diferentes lotes y marcas se encuentran representados en la Figura III.5.1; dichos promedios se conocen como perfiles de disolución. Todos los lotes cumplieron con las exigencias regulatorias en cuanto a su evaluación de similitud (f_2) y diferencia (f_1).

Los valores de los indicadores f_1 y f_2 fueron calculados empleando los datos adquiridos a los siguientes tiempos: 2, 7, 12, 18 y 26 minutos, de acuerdo a lo indicado en la normativa; es decir, sin tomar más que un dato cuando el principio activo se halle disuelto más del 85% (minuto 26 para el conjunto de las formulaciones).

En todos los casos se disolvió menos del 85% del principio activo en los primeros 15 minutos, el coeficiente de variación de los datos (CV%) fue menor al 20% en los primeros tiempos, y resultó menor al 10% para los puntos restantes; por último, el CV% global fue menor al 15%, en un todo de acuerdo con lo requerido por la normativa para dar validez a las

conclusiones.

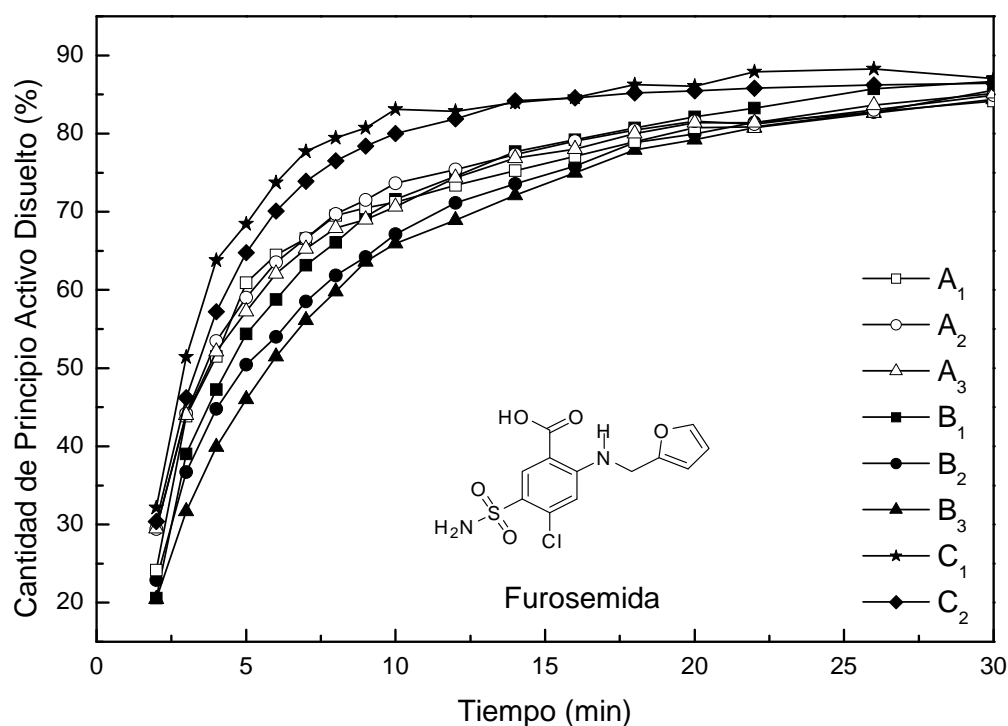


Figura III.5.1. Perfis de dissolução de comprimidos de FUR. Especialidade farmacéutica de referência A, lotes A₁, A₂ y A₃; medicamento genérico B, lotes B₁, B₂ y B₃ y medicamento genérico C, lotes C₁ y C₂.

En la Tabla III.5.2 se pueden observar resultados provenientes de la comparación de los distintos lotes pertenecientes a las diferentes marcas comerciales. El lote A₁ al ser contrastado contra sus congéneres A₂ y A₃ expuso resultados de factor diferencia bajos ($f_1= 2,7$ y $2,8$) y valores satisfactorios del indicador de similitud ($f_2= 78,0$ y $78,4$); análogamente, los parámetros f para los tres lotes de la marca B ($f_1= 4,0 - 3,7 - 6,5$ y $f_2= 77,0 - 70,7 - 63,5$) en su comparación con el lote A₁ indicaron que aquellos deberían ser considerados similares a éste. Mediante análisis similares, el ensayo f_1/f_2 también sugirió que los comprimidos de la marca B eran similares entre sí y con la marca A en general.

Por otra parte, cuando se compararon comprimidos de la marca A contra los de la marca C se puso en evidencia una gama diferente de valores de f_1/f_2 ($f_1= 6,4 - 11,3$ y $f_2= 53,7 - 64,6$), que tendieron más hacia la zona de incumplimiento cuando se analizaron contra los

datos del lote B₁ ($f_1= 9,2 - 11,2$ y $f_2= 51,3 - 56,2$), a pesar de cumplir con las exigencias de similitud.

Esta tendencia fue más evidente cuando los mismos fueron contrastados con los lotes B₂ y B₃, donde proporcionaron en algunos casos valores no condescendientes con la similitud. Sin embargo, ambos lotes de la marca C demostraron ser similares el uno con el otro ($f_1= 2,6 - 2,7$ y $f_2= 81,1$). Entre los lotes ensayados, ambos indicadores f permitieron llegar a la misma conclusión, excepto en el caso de la comparación B₂-C₁, donde el indicador f_1 sugirió similitud, aunque con un valor cercano al límite, mientras que su contraparte f_2 indicó que los lotes no eran similares.

Tabla III.5.2. Valores de factor similitud (f_2) y factor diferencia (f_1) para la comparación entre todas las marcas y todos los lotes de comprimidos de FUR.

Lote	Criterio	A ₁	A ₂	A ₃	B ₁	B ₂	B ₃	C ₁	C ₂
A ₁	f_1		2,7	2,8	4,0	3,7	6,5	11,3	8,9
	f_2		78	78,4	77	70,7	63,5	53,7	59,2
A ₂	f_1	2,8		1,0	5,0	6,6	9,4	8,8	6,4
	f_2	78		94,5	67,4	64,6	58,2	57,7	64,6
A ₃	f_1	2,9	1,0		4,3	5,9	8,7	9,4	7
	f_2	78,4	94,5		68,5	67,1	60,1	55,8	61,9
B ₁	f_1	4,0	4,8	4,2		4,8	6,1	11,6	9,2
	f_2	77	67,4	68,5		74,1	67,4	51,3	56,2
B ₂	f_1	3,6	6,2	5,6	4,7		2,6	14,5	12,1
	f_2	70,7	64,6	67,1	74,1		84,1	46,9	51,1
B ₃	f_1	6,1	8,6	8	5,7	2,6		16,7	14,4
	f_2	63,5	58,2	60,1	67,4	84,1		43,9	47,4
C ₁	f_1	12,7	9,7	10,4	13,1	16,9	20		2,7
	f_2	53,7	57,7	55,8	51,3	46,9	43,9		81,1
C ₂	f_1	9,7	6,8	7,5	10,1	13,8	16,8	2,6	
	f_2	59,2	64,6	61,9	56,2	51,1	47,4	81,1	

Para evaluar el funcionamiento del método PCA-CR, se llevó a cabo la prueba de Hotelling sobre el conjunto de datos y, ya que ningún dato discordante fue descubierto, los tantos ponderados de los dos primeros PCs de los distintos pares de lotes de FUR fueron representados gráficamente. Los resultados obtenidos son mostrados en la Figura III.5.2. Dichos gráficos contienen una elipse de confianza del 95% y las coordenadas de los valores de los tantos ponderados de la referencia y los lotes de prueba.

Para representar gráficamente las regiones donde la mayor parte de las muestras presentaron $f_2=50$, las cuales también son incluidas en la misma Figura, se utilizaron también técnicas de *bootstrapping*.^{203,206a}

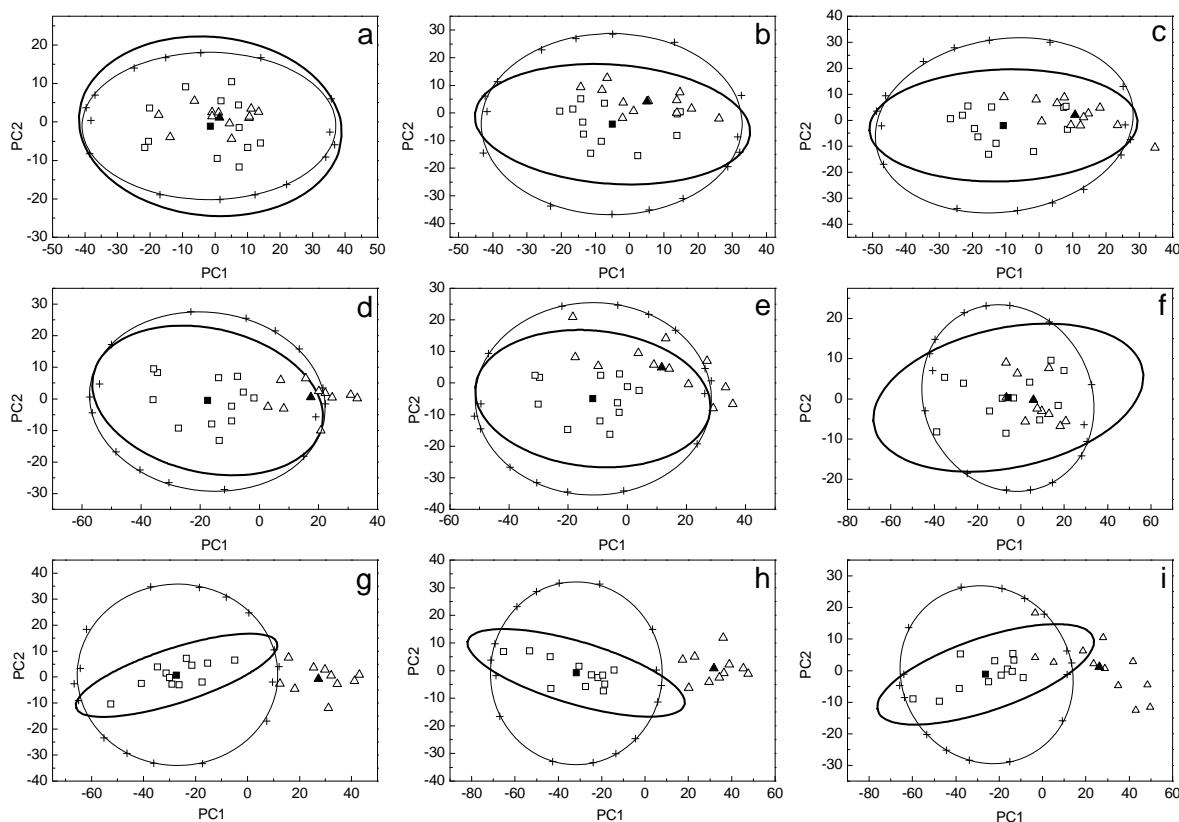


Figura. III.5.2. Método PCA-CR. Representación gráfica de los tantos ponderados (primeros dos PCs) para la comparación por pares de las curvas de disolución correspondientes a lotes de referencia (\square) y de prueba (Δ) de comprimidos de FUR. (a) A₁-A₂; (b) A₁-B₁; (c) A₁-B₂; (d) A₁-C₁; (e) A₁-C₂; (f) C₁-C₂; (g) B₂-C₁; (h) B₃-C₁; (i) B₃-C₂. También se encuentran representados la elipse de confianza del 95% (—), así como la región $f_2=50$ (-+-) y los promedios de los tantos ponderados de los conjuntos de referencia (■) y de prueba (▲).

En el caso particular de este trabajo, la simulación se implementó a partir de curvas de disolución medias, en las que se introdujeron variaciones arbitrarias a los perfiles de disolución con el objeto de lograr diferencias en los valores del parámetro f_2 , que se calculó en cada caso, al igual que los valores de las primeras dos componentes principales del conjunto de curvas de disolución así modificadas. La frontera del área donde f_2 alcanza el mínimo valor aceptable ($f_2= 50$) se representó gráficamente en el mismo sistema de coordenadas con el objeto de poder mejorar el entendimiento de las relaciones métricas entre el método propuesto y la técnica oficial.

La Figura III.5.2 muestra claramente que los lotes A_2 , B_1 y B_2 pueden ser considerados similares a A_1 (Figura III.5.2.a-c); sin embargo, a pesar de esto una de las muestras del lote B_2 cae fuera de la región de confianza del 95% (Figura III.5.2.c). Por otra parte, y contradiciendo las predicciones f_1/f_2 , entre A_1 y ambos lotes de la marca C resulta evidente la no “similitud”. Sin embargo, en la comparación A_1-C_1 sólo cuatro comprimidos del lote de prueba caen fuera de la elipse de confianza del 95%.

Como era esperado, en la comparación entre los lotes de las marcas B y C la no semejanza es claramente evidenciada por el método PCA-CR, a pesar de que algunos valores de f_2 observados se encuentran cerca del límite inferior aceptable ($f_2 > 45$).

Las conclusiones obtenidas tras aplicar el método PCA-CR para los lotes A y B mostraron un buen acuerdo con el resultado de las determinaciones correspondientes de f_1 y f_2 ; sin embargo, ambos métodos proporcionaron conclusiones diferentes para la comparación entre lotes de las marcas A y C. En la prueba f , la marca C exhibió cumplimiento pero los valores observados de f_1 ($> 6,0$) y de f_2 (< 60) están en una gama diferente que aquellos de marcas A y B. Este cumplimiento de frontera en la prueba f_2 en lotes de la marca C, fue reflejado en un veredicto de no similitud por el método PCA-CR. Ello sería consecuencia del hecho que este último método representa un estándar ligeramente más riguroso que el basado

en los indicadores f .

Tanto el método con base en los indicadores f como la metodología propuesta PCA-CR revelaron mayor cercanía de la marca C hacia la marca A que hacia la marca B. De hecho, la comparación basada en valores de f entre lotes de marcas A y C sugirió similitud, mientras la comparación análoga entre marcas B y C indicó no similitud en los casos $B_1/B_2-C_1/C_2$; análogamente, en el caso de PCA-CR, el dictamen fue de no similitud en cada caso. Por otro lado, del mismo modo que en la comparación a base de f , ambos lotes de la marca C (de análoga forma y tamaño) fueron consideradas similares el uno al otro.

Se encuentra extendida la idea que los factores similitud y diferencia aparecen como una solución simple y fácil de calcular para resolver el problema de la similitud entre marcas o lotes. Quizás esta sea la explicación de su adopción por la industria, a pesar de que ellos imponen restricciones a la calidad de los datos a ser usados como por ejemplo no más que un punto de la disolución encima del 85% y límites específicos al CV(%) en diferentes puntos, y que su resultado expone alguna dependencia con respecto al número y la posición de puntos temporales empleados.⁴⁸

En particular, la función de “similitud” f_2 ha sido criticada con severidad por varios autores²⁰⁷ argumentando que esta carece de justificación estadística²⁰⁸ y que emplea innecesariamente la transformación recíproca logarítmica de la raíz cuadrada, lo cual hace su distribución estadística muy complicada o casi inmanejable.²⁰⁹

Por el contrario, el método propuesto PCA-CR ofrece un modo simple, gráfico y analítico de decidir sobre la semejanza, empleando procedimientos matemáticos con fuerte soporte estadístico. Además, el mismo es capaz de hacer uso de todos los datos disponibles, independientemente de la cantidad de principio activo disuelto y de la variabilidad de los mismos; esto es sumamente ventajoso, ya que proporciona una mejor apreciación del comportamiento de disolución de los lotes comparados.

Resulta interesante destacar que se obtuvieron correlaciones significativas cuando el número de puntos de datos excluidos de las elipses de confianza fue enfrentado con los valores de f_2 y f_1 de las comparaciones correspondientes. Sin embargo, a pesar de la correlación con los indicadores f , el método PCA-CR representa un estándar más riguroso, que se encuentra desprovisto de la mayoría de las principales desventajas de dichos indicadores.

III.5.4.3. Disolución de comprimidos de Acetaminofeno. Comparación entre marcas

La Figura III.5.3 muestra los perfiles de disolución de tres marcas comerciales diferentes de comprimidos de acetaminofeno, presentes en el mercado local.

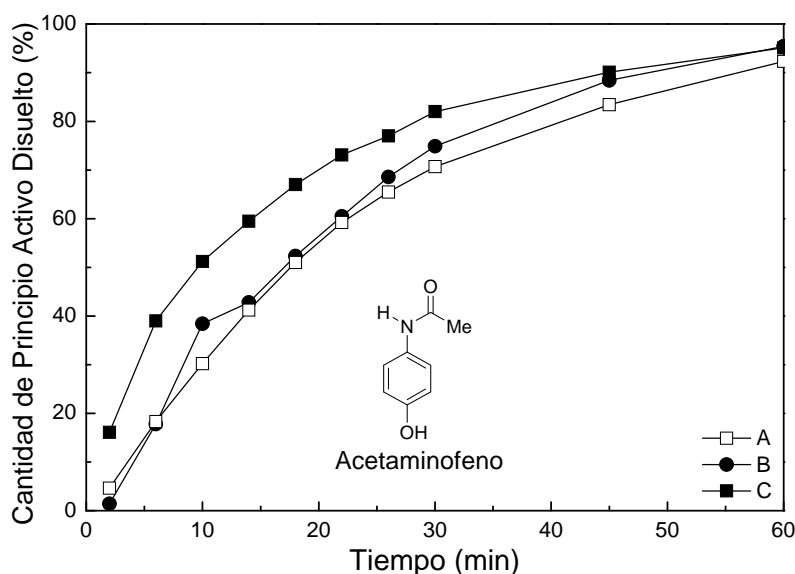


Figura III.5.3. Perfiles de disolución pertenecientes a tres lotes de comprimidos de acetaminofeno de 500 mg. La curva A corresponde al producto de referencia; B y C son marcas genéricas.

La Tabla III.5.3 contiene los valores de f_2 y f_1 de todas las comparaciones posibles entre marcas, calculadas con datos tomados a 6, 10, 14, 30 y 45 minutos. Según los criterios f , sólo las marcas A y B deberían ser consideradas similares.

En cuanto a la marca C, ésta mostró valores de f_1 y f_2 que sugirieron una situación de

posible frontera en la confrontación con la marca B ($f_1= 15,2$ y $17,7$; $f_2= 47,4$), aunque esta reuniría las condiciones de un caso apto para ser sometido a evaluación en una segunda etapa de prueba.^{15,60,210} En el gráfico de tantos ponderados de PCA se evidenció que ninguno de los lotes de la marca C fue capaz de alcanzar las exigencias de similitud (Figura III.5.4c).

Tabla III.5.3. Valores de f_2 y f_1 de comparaciones entre marcas de tres lotes de acetaminofeno.

Marca	Criterio	A	B	C
A	f_1		7,4	20,0
	f_2		65,8	43,2
B	f_1	7,9		15,2
	f_2	65,8		47,4
C	f_1	25,0	17,7	
	f_2	43,2	47,4	

La misma conclusión de no similitud fue obtenida después de la comparación entre las marcas A y C (Figura III.5.4.b). En el gráfico también se muestra la comparación entre las marcas A y B (Figura III.5.4.a) y entre las marcas B y A (Figura III.5.4.d), de donde se desprende una conclusión de similitud. La misma está de acuerdo con la decisión en base a los indicadores f , sin embargo, resulta interesante destacar que en la comparación B-A, debido a la diferente variabilidad de datos dentro de la marca de referencia (B), la marca de prueba (A) expone dos curvas de disolución en la región de frontera.

Por otro lado, las áreas de las elipses de confianza del 95% no siempre resultaron más pequeñas que el tamaño de las regiones encerradas por las respectivas curvas $f_2= 50$, obtenidas mediante el procedimiento de *bootstrapping*. Esto se debe a que, a diferencia del procedimiento f_2 , el tamaño de las elipses de confianza está relacionado con la variabilidad de los datos en las muestras de referencia, pero también con la forma y el tamaño de las curvas de disolución.

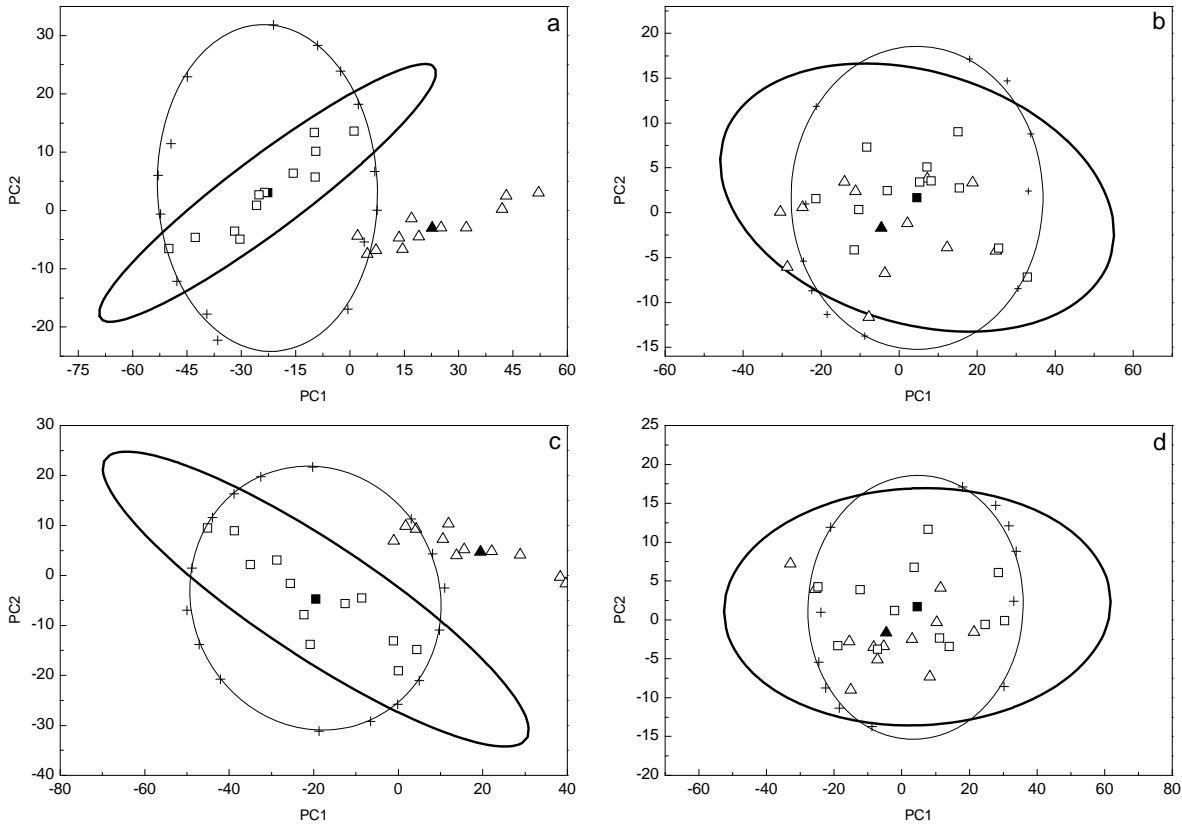


Figura. III.5.4. Representación gráfica de las comparaciones PCA-CR de pares de perfiles de disolución pertenecientes a las marcas tomadas como referencia (\square) y prueba (Δ) de comprimidos de acetaminofeno. (a) A–B; (b) A–C; (c) B–C; (d) B–A. También se encuentran trazadas las elipses del 95% de confianza (—) y las regiones de valores $f_2=50$ (---), así como el promedio de tantos ponderados de los lotes de referencia (\blacksquare) y de prueba (\blacktriangle).

III.5.4.4. Datos de disolución de Tsong y Hammerstrom

Estos datos de disolución (Figura III.5.5) han sido anteriormente empleados como material de referencia en diferentes métodos de comparación de perfiles de disolución.^{205, 211} Todos los valores f_1/f_2 posibles de las comparaciones por parejas entre los tres lotes estándar (A_1 , A_2 y A_3) y un cuarto lote (B) se encuentran consignados en la Tabla III.5.4. Los resultados indican que los lotes de referencia presentan características de disolución que los acreditan como similares entre sí.

Sin embargo, los valores de f_2 para el lote de prueba B contra los lotes de referencia A están en una gama notablemente diferente (63,8 – 63,5 – 64,7) a los valores registrados para la comparación de los lotes A entre sí (90,3 – 94,6). Los gráficos de los tantos ponderados de los

primeros dos PCs pertenecientes a los tres lotes pre-aprobados (A_1 , A_2 y A_3) y al lote de prueba B se encuentran representados en la Figura III.5.6.

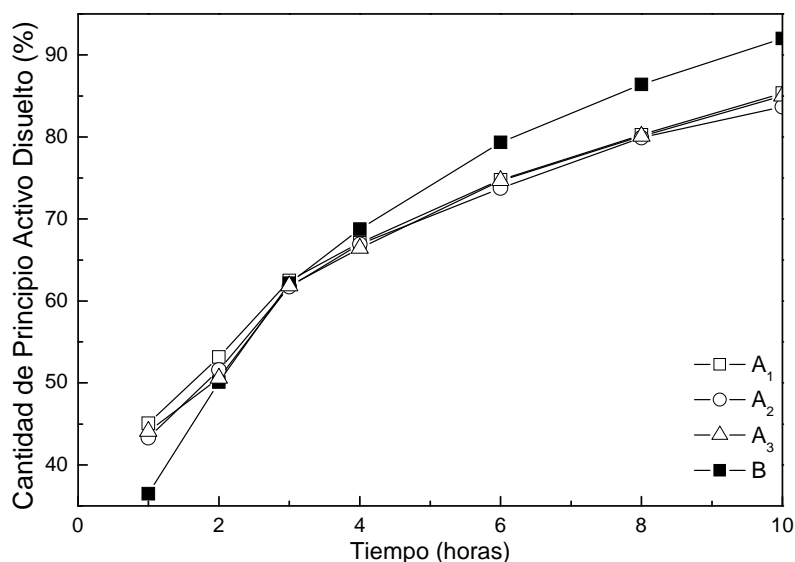


Figura. III.5.5. Perfiles de disolución de tres lotes aprobados (A_1 , A_2 , A_3) y un nuevo lote de prueba (B), según Tsong y Hammerstrom (1994).

Tabla III.5.4. Valores de f_1 y f_2 resultantes de todas las comparaciones posibles entre pares de lotes para tres lotes pre-cambio y un lote post-cambio (Tsong y Hammerstrom, 1994).

Criterio	Lote	A_1	A_2	A_3	B
f_1	A_1		1,6	1,2	1,5
f_2			90,3	91,2	63,8
f_1	A_2	1,6		0,4	3,1
f_2		90,3		94,6	63,5
f_1	A_3	1,2	0,4		2,7
f_2		91,2	94,6		64,7
f_1	B	1,5	3,0	2,7	
f_2		63,8	63,5	64,7	

Todas las comparaciones basadas en PCA de los mismos demostraron su similitud. A pesar de esto el gráfico de comparación A_1 - A_2 expuso dos comprimidos del lote de prueba fuera de la elipse de confianza del 95% y las comparaciones A_2 - A_3 y A_1 - A_3 mostraron un

comprimido cada una fuera de la región de confianza.

Por otra parte, la comparación por parejas de los lotes A_1 y A_2 con el lote de prueba B, reveló que éste no podría ser considerado similar a ninguno de ellos, aunque sorprendentemente cumpla con exigencias de similitud con el lote A_3 . Ello se debería principalmente a la gran variabilidad de los datos inherente al mismo. A pesar de esto, los criterios f_1/f_2 sugieren la semejanza entre todos los perfiles de disolución, lo cual es de algún modo concordante con las conclusiones alcanzadas por Tsong.

Los valores calculados mediante procedimientos de *bootstrapping* para la prueba f_2 , mostrados en la Figura III.5.6 revelan la naturaleza más permisiva de la evaluación a cargo del indicador f_2 .

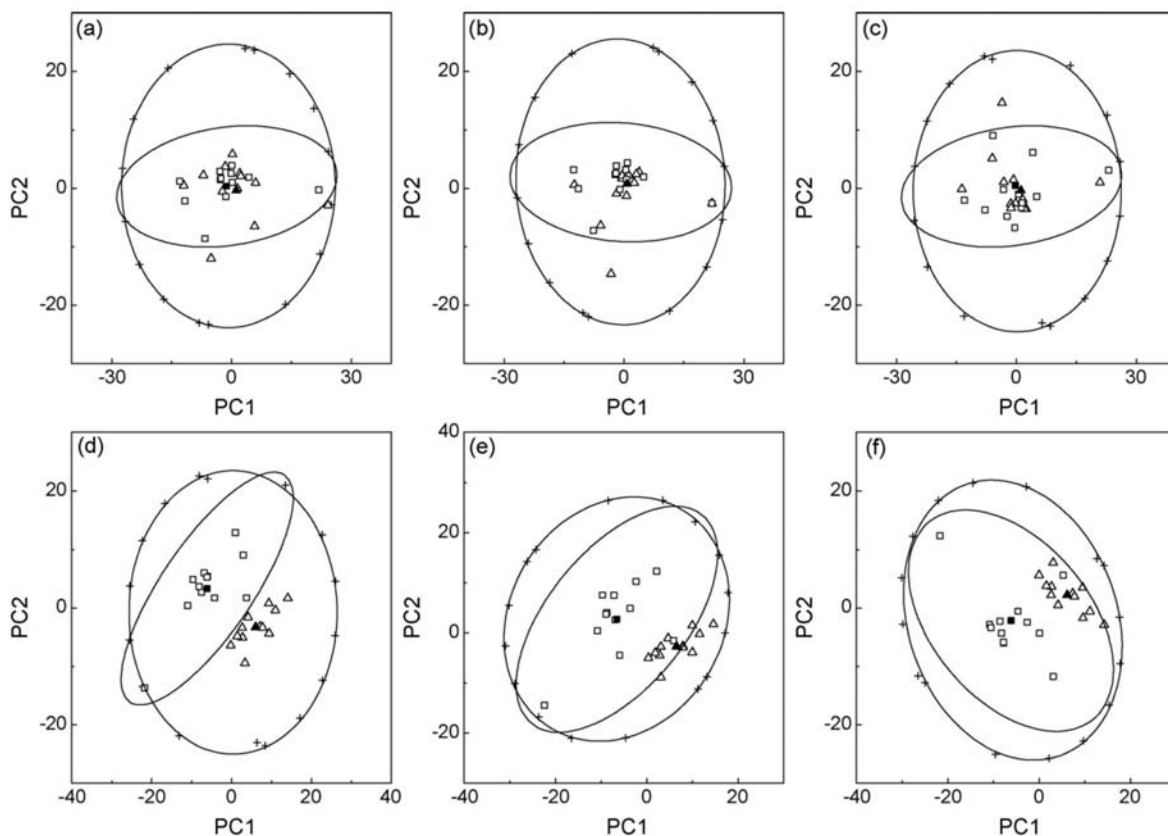


Figura III.5.6. Comparaciones basadas en PCA [referencia (\square) y prueba (Δ)] entre lotes de A_1 , A_2 y A_3 , así como el nuevo lote B. Datos de Tsong y Hammerstrom (1994). (a) A_1 - A_2 ; (b) A_2 - A_3 ; (c) A_1 - A_3 ; (d) A_1 -B; (e) A_2 -B; (f) A_3 -B. Se representan asimismo la elipse de confianza del 95% (—), los valores $f_2=50$ calculados mediante técnicas de *bootstrap* (-+-), y los valores promedio de las PCs de los lotes de referencia (■) y de prueba (▲).

Otro rasgo importante del método PCA-CR es que tiene en cuenta la variabilidad de los datos, en contraste con el criterio f_2 , más rígido y que ha sido criticado por no contemplar la variación dentro de los conjuntos de datos de referencia y prueba. En relación con este costado desfavorable del indicador f_2 , algunos autores han recomendado la interpretación cuidadosa de los resultados de las comparaciones cuando las discrepancias entre las curvas de disolución individuales de un mismo lote son muy grandes.²¹²

La región de confianza del 95% y la concesión de hasta el 20% de las muestras de prueba fuera de la elipse de confianza del 95%, transforma al método propuesto en un estándar más estricto que el provisto por los indicadores f_1/f_2

III.5.4.5. Datos de disolución de pre y post-cambio de Sha y col. (1998)

Los resultados de los indicadores f_1/f_2 para los datos de disolución de cinco lotes de post-cambio contra un lote pre-cambio se encuentran consignados en la Tabla III.5.5 y sus perfiles medios se muestran en la Figura III.5.7.

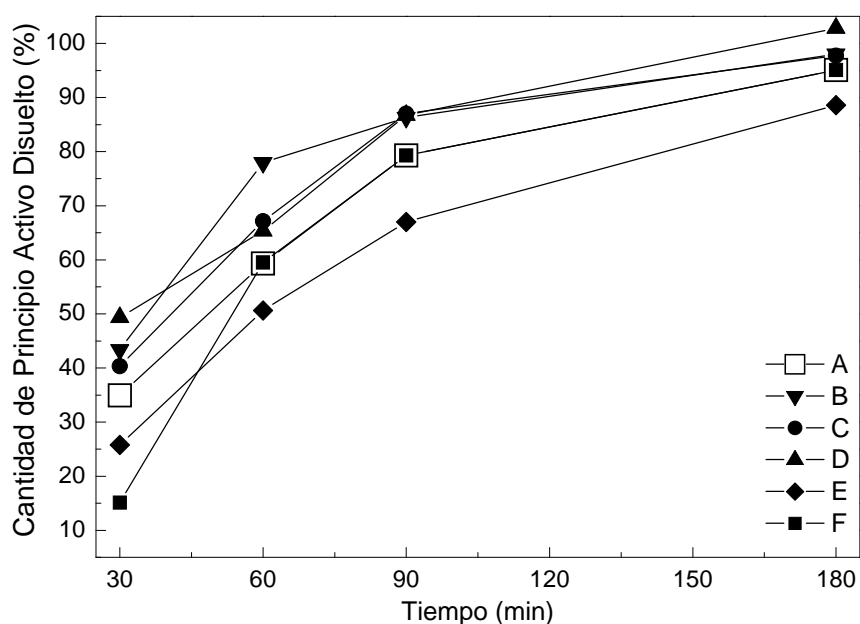


Figura. III.5.7. Perfiles de disolución de un Lote pre-cambio (A) y cinco lotes post-cambio (B-F), según Sha y col. (1998) y Ma y col. (2000).

Puede observarse que, a pesar de las diferencias entre las curvas y según los criterios f , todos los lotes de post-cambio cumplen con las exigencias para similitud, aunque los resultados parecen ser de frontera ($f_1 > 13$ ó $f_2 < 60$). En el estudio de este conjunto de datos, Ma y col. concluyeron que, dependiendo del método empleado para la comparación (diferente de los indicadores f), a lo sumo los lotes C y F podrían ser considerados similares al lote A (Ma y col. 2000),²⁰⁴ aunque esta conclusión provisoria podría llegar a variar al cambiar los criterios de evaluación.

Tabla III.5.5. Comparación de perfiles de disolución entre un lote pre-cambio (A) y cinco lotes post-cambio (B-F). Cálculo de los factores similitud (f_2) y diferencia (f_1).

Criterio/Lote	B	C	D	E	F
f_1	13,8	8,8	13,3	13,6	7,4
f_2	55,4	67,1	58,4	58,7	57,5

El análisis PCA-CR de los datos (Figura III.5.8), realizado luego de comprobar la ausencia de datos discordantes, reveló que inclusive el lote C no alcanza las exigencias de similitud, mostrando cinco de sus 12 unidades fuera de la elipse de confianza.

Una inspección más cercana de las curvas de disolución de los lotes A y C indicó que los valores de CV% de las curvas del lote C a diferentes tiempos (10,6; 9,9; 5,7 y 1,6%), fueron distintos a los correspondientes del lote de referencia A, que tuvo una dispersión de datos relativamente menor a idénticos tiempos (6,7; 4,8; 3,8 y 2,9%, respectivamente). Esto puede proporcionar una explicación a la discrepancia entre los resultados de la Tabla III.5.5 y el dictamen de no similitud provisto por PCA-CR, que sería una consecuencia de la buena sensibilidad de este último a la variabilidad en los datos, en particular los correspondientes al lote de referencia.

La prueba multivariada permitió concluir que a pesar de las formas aparentemente análogas de los perfiles de disolución de referencia y de prueba, las curvas de disolución

individuales presentaron comportamientos claramente diferentes en ambos lotes, por lo cual el criterio de “similitud” para el lote no podría ser alcanzado.

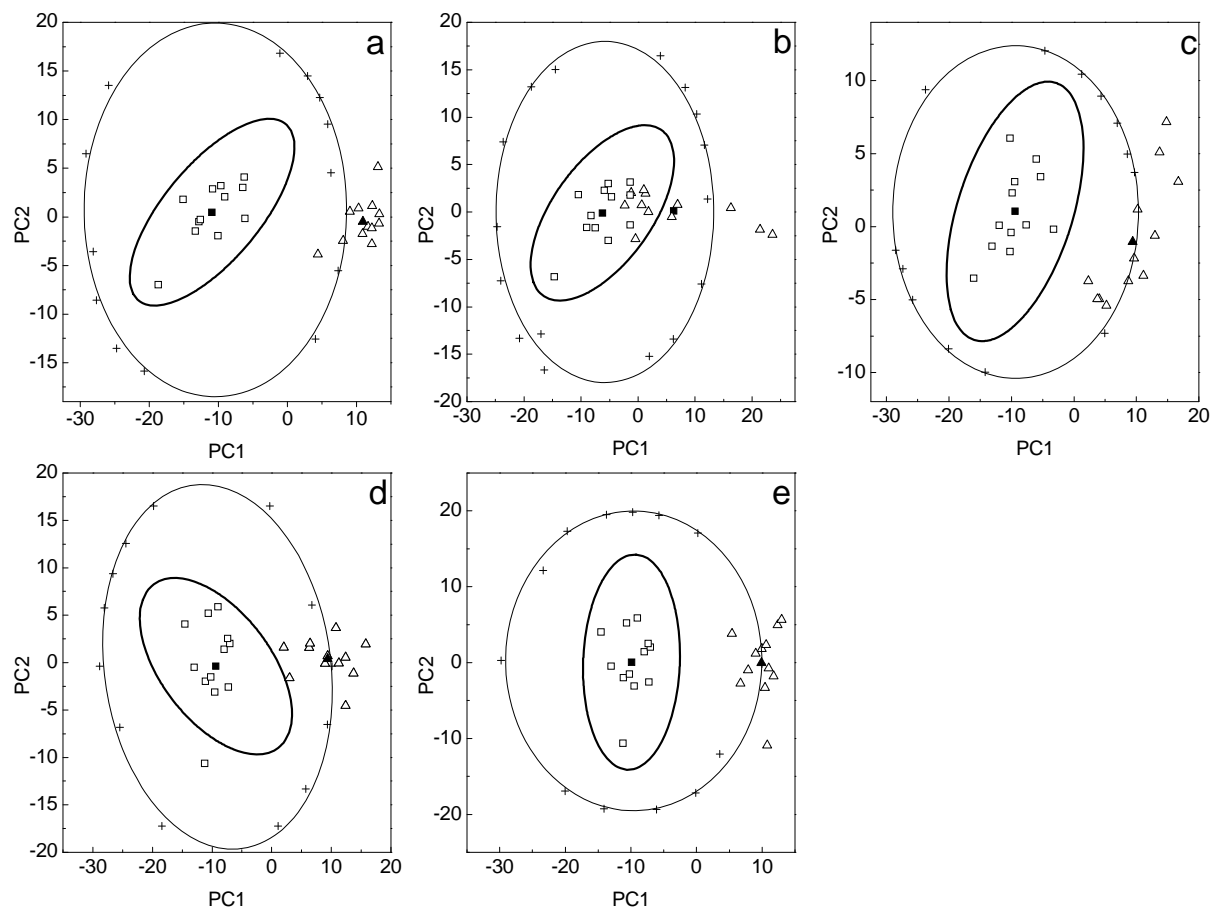


Figura III.5.8. Representación gráfica (a-e) de las comparaciones basadas en PCA-CR [referencia (□) y prueba (Δ)] entre el lote pre-cambio A y lotes de post-cambio B-F, respectivamente. También se representan las elipses del 95% de confianza (—), las elipses $f_2=50$ (—+—), provenientes de la técnica de *bootstrapping*, y las coordenadas promedio de los dos primeros PCs de los lotes de referencia (■) y de prueba (▲).

Cuando los perfiles de disolución del lote pre-cambio A y el lote post-cambio F fueron comparados, evidenciaron tener similar CV% (15,0, 4,8, 3,8 y 2,8%, respectivamente, para el lote F); sin embargo, pudo observarse que el porcentaje de principio activo disuelto resultó similar en todos los tiempos a excepción del primero, hecho que provocó un cambio en la forma de la curva para el lote F. Debido a que PCA-CR es sensible a cambios de forma y

tamaño de las curvas de disolución,^{Adams53} el método fue capaz de interpretar al lote F como no similar.

III.5.5. Conclusiones

Se propuso el empleo de gráficos de tantos ponderados de los componentes principales relevantes de las curvas de disolución con regiones de confianza del 95% (PCA-CR) como una estrategia nueva, útil para la comparación de los perfiles de disolución *in vitro* de formas farmacéuticas sólidas y una alternativa ventajosa al uso de los indicadores f_1 y f_2 .

Se estudiaron cuatro casos diferentes, representando problemáticas diversas. Los resultados observados con este enfoque multivariado del problema de la similitud de perfiles de disolución demostraron una buena correlación cualitativa con los valores de f_1 y f_2 calculados para las comparaciones entre dichos perfiles de disolución; sin embargo, las conclusiones en cuanto a la similitud de los perfiles no siempre fueron coincidentes.

Esta divergencia se debió principalmente a que, a diferencia del indicador f_2 , el método propuesto tiene en cuenta la variabilidad de los datos dentro del lote de referencia para construir las elipses de confianza, por lo que resultó ser más discriminante. El método propuesto también es sensible a la variabilidad dentro del lote de prueba, así como a la forma y el tamaño de las curvas de disolución, factores que tienen influencia sobre el resultado final.

A diferencia de los métodos f_1/f_2 , basados en la comparación del promedio de los datos, el empleo de elipses de confianza construidas a partir de los valores de las PCs de las curvas de disolución de comprimidos individuales del conjunto de referencia permitió una evaluación simple, rápida y gráfica de distribución de datos, tomando asimismo en cuenta diferencias de comportamiento individuales.

Además, el método propuesto se caracteriza por no imponer restricciones a la utilización de datos en términos de su variabilidad y/o grado de disolución, haciendo uso de

toda la información disponible. Esta característica evita que los resultados sean dependientes del número de puntos temporales seleccionados para el análisis, como ocurre en los métodos de comparación basados en criterios f .

En comparación con metodologías anteriormente publicadas basadas en PCA, la operación SVD realizada sobre una única matriz, la cual contiene los datos del conjunto de prueba y los datos del producto de referencia, permite la optimización de parámetros del sistema, de modo tal que se obtiene una proyección mejorada de los valores de las PCs del conjunto de prueba en el espacio de los datos de referencia.

Por su parte, el empleo de técnicas de *bootstrapping* para la representación de las fronteras $f_2= 50$ en el espacio de PCs, y su comparación con la región incluida por las elipses del 95% de confianza, demostró claramente una correlación entre el funcionamiento de las metodologías propuestas, revelando a PCA-CR como un instrumento más estricto pero aún así sumamente útil para proporcionar desde el punto de vista farmacéutico la evaluación de similitud entre lotes diferentes del mismo producto, o productos de marcas diferentes que contienen el mismo ingrediente activo.

III.6. APLICACIÓN DEL MÉTODO PCA-CR Y USO DE MAPAS AUTO-ORGANIZABLES PARA DETERMINAR LA IDENTIDAD DE POLIMORFOS EN FORMAS FARMACÉUTICAS SÓLIDAS

III.6.1. Generalidades

El polimorfismo cristalino ha recibido extensa atención académica e industrial por lo que ha sido el sujeto de cientos de publicaciones y numerosas revisiones. Sin embargo, aún en este momento, son desconocidos la totalidad de los efectos de polimorfismo sobre la estabilidad física, química, de manufactura, o la absorción oral.

Como se mencionó previamente, un material cristalino donde, las moléculas se arreglan en varias formas (redes cristalinas) dependiendo de las condiciones particulares de cristalización, se denomina polimorfo y también se llama de igual manera a cada uno de sus ordenamientos y a la forma amorfa.

Las propiedades diferenciales observadas como consecuencia de la recristalización de un compuesto pueden deberse tanto a la solvatación (pseudopolimorfismo) como al polimorfismo verdadero. Los métodos de exploración usados para estudiar estas manifestaciones son idénticos en ambos casos y por ello, la distinción entre un solvato y un polimorfo no siempre está marcada nítidamente en la práctica.

En esencia, la importancia del polimorfismo en la industria farmacéutica radica en las propiedades diferenciales de los polimorfos. Por ejemplo, para furosemida existen diferencias en solubilidad, porcentaje de disolución, punto de fusión, biodisponibilidad,¹²⁵ resistencia a la degradación,²¹³ y la estabilidad, que muchas veces afectan su eficacia terapéutica. Por lo general, sólo uno de los polimorfos es estable a una temperatura dada, mientras que los demás son meta-estables, tendiendo a desarrollarse a la fase estable con el tiempo. Este hecho requiere incrementar los cuidados que se deben tomar al formular un principio activo que posee polimorfos.

III.6.2. El Problema Analítico

Distintas autoridades regulatorias han establecido la necesidad de controlar el polimorfo utilizado como principio activo para asegurar su integridad durante la preparación y el almacenamiento.

Las estrategias analíticas utilizadas habitualmente para identificar, caracterizar y determinar polimorfos cristalinos incluyen metodologías de tipo estructural, espectroscópica, térmica y otras basadas en la solubilidad y en la densidad.²¹⁴ En la Tabla III.6.1. se pueden observar las distintas metodologías pertenecientes a las anteriores categorías, utilizadas habitualmente para la caracterización de polimorfos.

Tabla III.6.1. Clasificación de las diferentes metodologías analíticas utilizadas en la práctica para caracterizar y determinar polimorfos.

Categoría	Metodologías
Estructurales	Difracción de Rayos X ^{214 a,l}
Espectroscópicos	Espectroscopia IR ^{214a,f,i,l}
	Espectroscopia de RMN de Sólidos ^{214 c,l}
	Espectroscopia Raman ^{214d,l}
Térmicos	Calorimetría diferencial de barrido ^{214g,h,i,l}
	Análisis termogravimétrico ^{214g,h,i}
Basados en la solubilidad	Microcalorimetría ^{214j}
	Solubilidad ^{214l}
Basados en la densidad	Flotación ^{214m}
	Picnometría ^{214l}

Entre ellas, la más destacada por su asequibilidad resulta ser la espectroscopia en el IR, en todas sus modalidades, aunque plantea la necesidad de contar *a priori* con patrones o espectros de referencia de los polimorfos.

Como se enunció anteriormente, las propiedades diferenciales de los polimorfos

referidas a su solubilidad han sido utilizadas con anterioridad para caracterizar los distintos polimorfos de una droga. Paralelamente, el ensayo de disolución es un método *in vitro* que constituye una herramienta útil y económica para asegurar la calidad de una FFS en las diferentes etapas del proceso de producción. El mismo es capaz de detectar y poner en evidencia la influencia de diversos factores, entre ellos el polimorfismo de sus componentes, proporcionando un mecanismo de control global del proceso de fabricación.

La Furosemida es un diurético ampliamente utilizado en la clínica y como reactivo de diagnóstico para evaluar el efecto terapéutico de un principio activo sobre la insuficiencia renal. FUR presenta un estado amorfo, tres formas cristalinas (P-I, P-II y P-III) y sendos solvatos de dimetilformamida y dioxano (ambos excluidos de este estudio ya que no presentan uso en humanos).¹²⁵

La presencia de cada forma dicta la solubilidad del producto; puesto que FUR posee baja solubilidad en agua, diferencias en la composición polimórfica influyen en la tasa de su absorción en el cuerpo humano y por ello en la biodisponibilidad del principio activo.

En vista de las propiedades de disolución diferenciales de los polimorfos y la excelente capacidad de evaluación de las formas farmacéuticas por parte del perfil de disolución, en esta etapa también se estudió el desarrollo de un método analítico cualitativo capaz de diferenciar las distintas formas cristalinas de un principio activo mediante la aplicación de técnicas multivariadas como PCA-CR acoplada a perfiles de disolución. También se propuso la evaluación de perfiles de disolución de formas farmacéuticas sólidas por medio de redes neuronales artificiales asociadas a mapas auto-organizables.

III.6.3. Caracterización de los Polimorfos

La pureza química de la FUR de partida fue establecida por volumetría, utilizando el procedimiento de la USP 30.⁶⁰ El carácter polimórfico de las formas del principio activo fue

establecido mediante espectrofotometría FTIR, siguiendo las condiciones experimentales descritas por Matsuda y Tatsumi, con leves modificaciones.¹²⁵

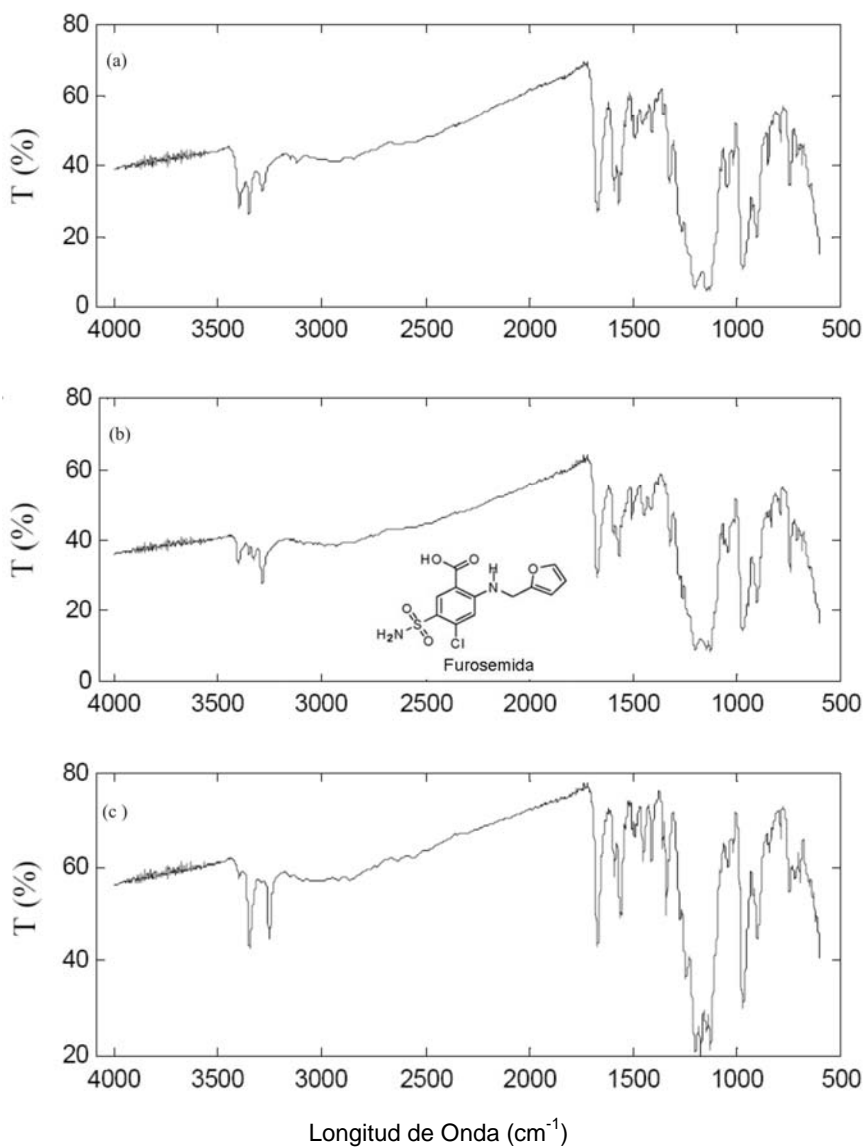


Figura III.6.1. Espectros FTIR (mull de Fluorolube entre dos pastillas de NaCl). a) Polimorfo I (P-I); b) Polimorfo II (P-II) y c) Polimorfo III (P-III).

La Figura III.6.1 muestra que cada uno de los espectros FTIR de los polimorfos I, II, y III (Figuras III.6.1.a, III.6.1.b y III.6.1.c respectivamente) presenta un patrón de bandas particular en la zona de 3600 a 3000 cm^{-1} . Una de las características más importantes en la diferenciación de los polimorfos de FUR es la altura del pico correspondiente al estiramiento

N-H de la amina secundaria situado en 3370 cm^{-1} ; existiendo un incremento en la absorción en el pico correspondiente a 3420 cm^{-1} al desplazarse del polimorfo I al polimorfo III.

Se observaron deformaciones características de los diferentes cristales durante el calentamiento de los mismos mediante estudios de termomicroscopia, los cuales fueron llevados a cabo con un microscopio con platina calefaccionada. Las deformaciones coincidieron con las relatadas por Matsuda y col.¹²⁵

III.6.4. Disolución de Cápsulas Conteniendo los Diferentes Polimorfos

Luego de la confirmación de la identidad de los polimorfos de los productos de partida, el trabajo se centró en la determinación de la forma polimórfica de FUR contenida en productos farmacéuticos formulados, a partir de sus perfiles de disolución, ya que éste es prácticamente el único ensayo de rutina sensible a diferencias tan sutiles en la formulación.

La Figura III.6.2 muestra las curvas promedio de disolución (perfiles) de lotes de 12 cápsulas que contienen los distintos polimorfos, utilizando soluciones reguladoras oficiales de la USP 30 de pH= 2,2; 4,1 y 5,8 como medios de disolución.⁶⁰

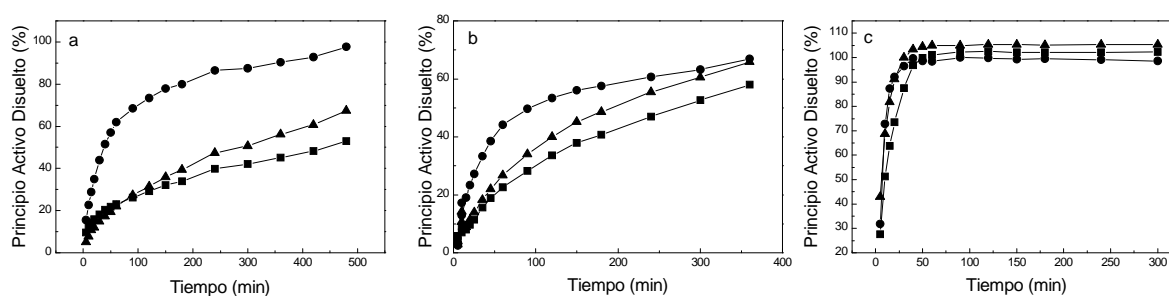


Figura III.6.2. Perfiles de disolución de cápsulas conteniendo P-I (●), P-II (▲) y P-III (■), en 900 mL de medio de disolución USP a diferentes pH. a) 2,2; b) 4,1 y c) 5,8.

A pH= 5,8, recomendado por USP 30⁶⁰ para realizar el ensayo de disolución de FUR, no se observaron diferencias significativas en la disolución entre los distintos polimorfos,

mientras que al descender el pH se hizo evidente la diferenciación de los polimorfos entre sí. Al correlacionar los datos de disolución de los polimorfos entre sí, se observó que el menor coeficiente de correlación tenía lugar a $\text{pH} = 2,2$. Debido a esto, dicho pH fue considerado como la condición más discriminante, siendo seleccionado para el desarrollo propuesto.

III.6.5. Caracterización de los Polimorfos Mediante PCA-CR

El método PCA-CR fue propuesto para establecer la identidad del polimorfo de FUR contenido en una forma farmacéutica sólida. Cada muestra estuvo representada por 12 cápsulas, las cuales fueron sometidas al ensayo de disolución en diversos días, con el fin de incorporar la variabilidad diaria al modelo.

El número de factores óptimo para el modelo fue establecido mediante la determinación del número de componentes principales que contienen más del 95% de la información de la muestra. Como se puede ver en la Figura III.6.3, para todos los polimorfos el uso de dos PCs permitió explicar el modelo con un grado superior al de la cota establecida, de 95%.

Siguiendo los lineamientos de la Sección III.5, luego de algunos experimentos de prueba y error, se adoptó el siguiente criterio para la toma de decisión: por lo menos 80% de las unidades del lote de prueba²¹¹ deben permanecer dentro de la región de confianza del 99% del lote del polimorfo de referencia. Por analogía con lo discutido en dicha Sección, el requerimiento de “*por lo menos 80%*” permite tener en cuenta la variabilidad de los datos en el conjunto de prueba, mientras que la elipse de confianza del 99% considera la separación mínima entre los grupos de tantos ponderados.

Luego de que la prueba de Hotelling fuera llevada a cabo y ya que ningún dato discordante fuera descubierto, los tantos ponderados de los dos primeros PCs de los pares de lotes de polimorfos de FUR fueron representados gráficamente y los resultados obtenidos son mostrados en la Figura III.6.4. Los gráficos constan de una elipse correspondiente al 99% de

confianza y las coordenadas de los valores de los tantos ponderados del lote de referencia y los correspondientes al lote de prueba. Se utilizaron también técnicas de *bootstrapping*,²⁰⁶ para hallar y representar las áreas donde la mayor parte de las muestras expondrían $f_2 = 50$.

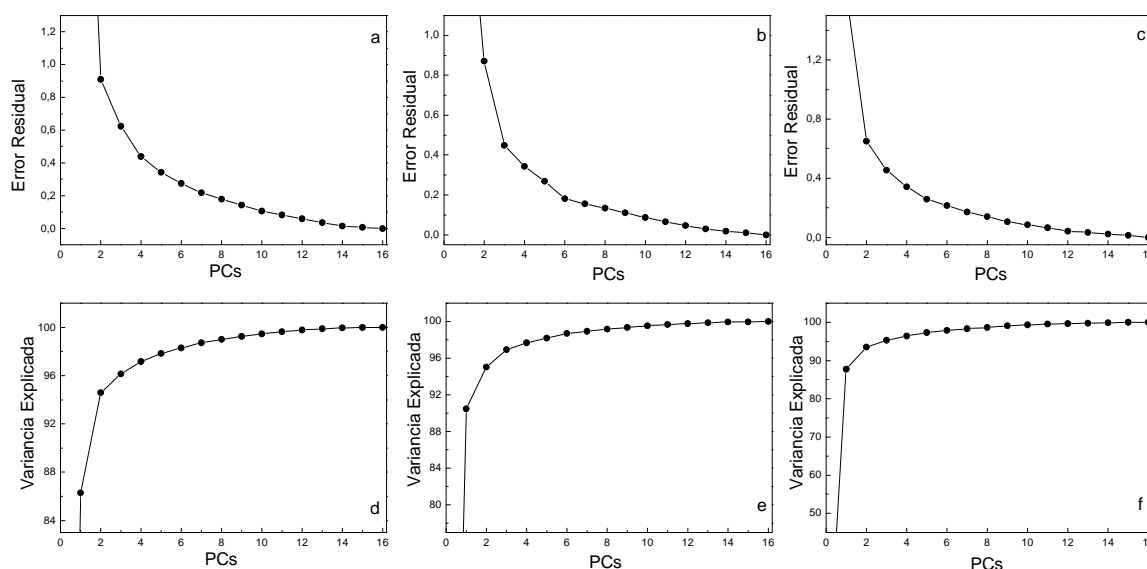


Figura III.6.3. Arriba: Error residual en la reconstrucción de la matriz de datos en los diferentes casos a) P-I; b) P-II y c) P-III. Abajo: Porcentaje de variancia explicada frente al número de componentes principales en los casos d) P-I; e) P-II y f) P-III.

Las imágenes claramente muestran que los perfiles de disolución de los polimorfos P-I P-II y P-III no pueden ser considerados similares entre sí por el método PCA-CR, bajo las condiciones previamente especificadas (Figuras III.6.4 a-f). A pesar de esto, se observó una marcada proximidad entre las muestras pertenecientes a P-II y P-III (Figuras III.6.4.d y III.6.4.f), la cual no pudo ser puesta en evidencia por el empleo de otras técnicas como las basadas en los estimadores f_1/f_2 ; este hecho también quedó expuesto mediante las áreas $f_2 = 50$ obtenidas por *bootstrapping*, donde para ambos casos las muestras pertenecientes P-II resultaron contenidas en la región $f_2 = 50$ del P-III, y viceversa.

Al comparar perfiles de disolución de los lotes de referencia, conteniendo los polimorfos P-I, P-II y P-III, con los pertenecientes a cápsulas que contienen un producto

comercial en su interior, se observó que el mismo mantuvo un comportamiento muy cercano al del P-I, pudiendo ser considerado similar al mismo mediante PCA-CR, según los criterios pre-establecidos. Con este resultado se podría suponer que los polimorfos presentes en ambas cápsulas (tanto la que contiene el producto comercial como la que contiene P-I) son el mismo.

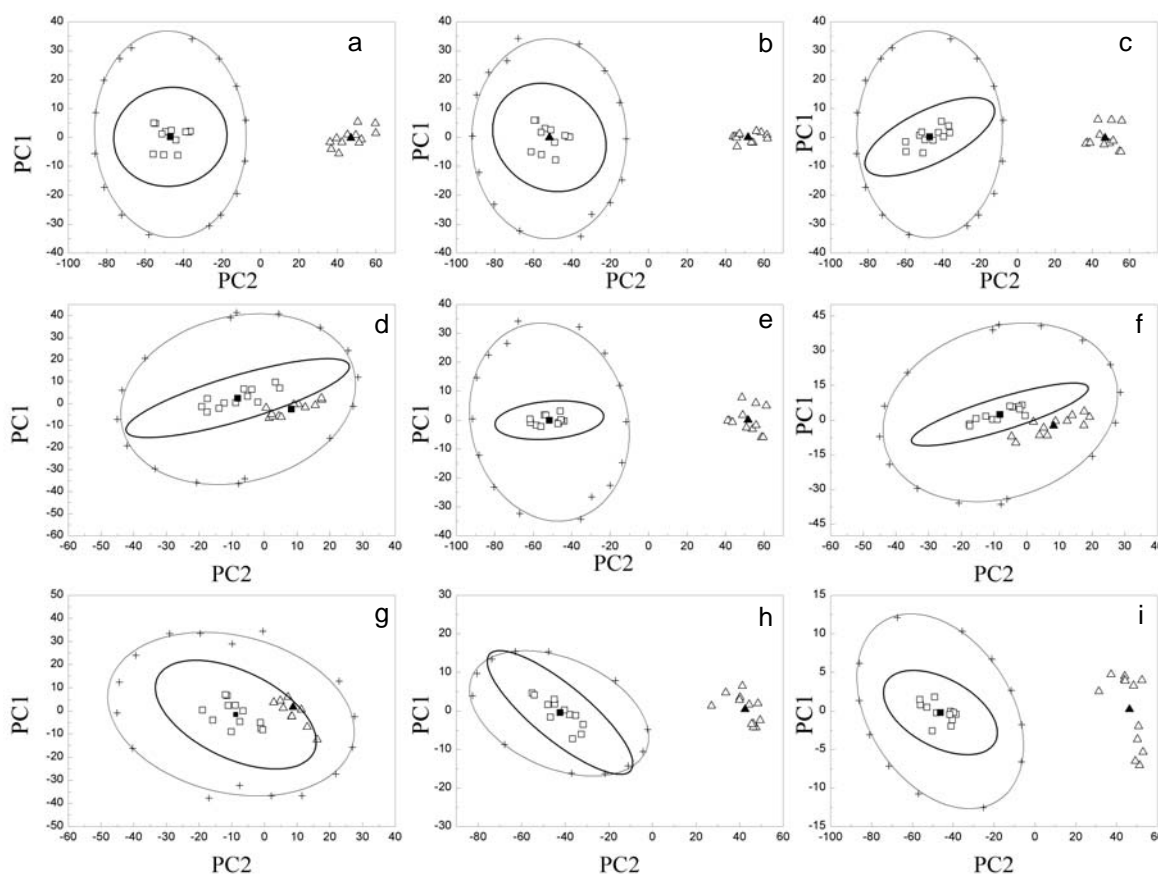


Figura III.6.4. Comparaciones PCA-CR [referencia (□) y prueba (Δ)] entre lotes de polimorfos P-I—P-II (a), P-I—P-III (b), P-II—P-I (c), P-II—P-III (d), P-III—P-I (e), P-III—P-II (f) y con el producto comercial P-I—Comercial (g), P-II—Comercial (h) y P-III—Comercial (i). También se encuentran representadas gráficamente las elipses de confianza del 99% (—), las elipses resultantes del *bootstrapping* señalando la zona $f_2=50$ (-+-) y las coordenadas promedio de los PCs de los lotes de referencia (■) y de prueba (▲).

Merece un comentario a parte el hecho que las diferencias de formulaciones radican solamente en el contenido de Estearato de Mg, que es el lubricante más utilizado en la formulación de cápsulas y comprimidos. El mismo no presenta una interacción conocida con FUR, sin embargo, si existiese alguna, probablemente sería una acción negativa sobre la

disolución,¹¹ confiriendo menores tasas de disolución en los puntos temporales para los perfiles. En este caso particular, el polimorfo del P-I es el de mayor tasa de disolución; de existir una interacción no modelada en los componentes del comprimido comercial, ésta se traduciría en una menor disolución de FUR. Este hecho se contrapone con la observación experimental del perfil de disolución, ya que las cápsulas preparadas a partir de material del comprimido comercial se disuelven en igual o mayor medida que las de P-I (el más soluble de los tres), como se muestra en la Figura III.6.5.

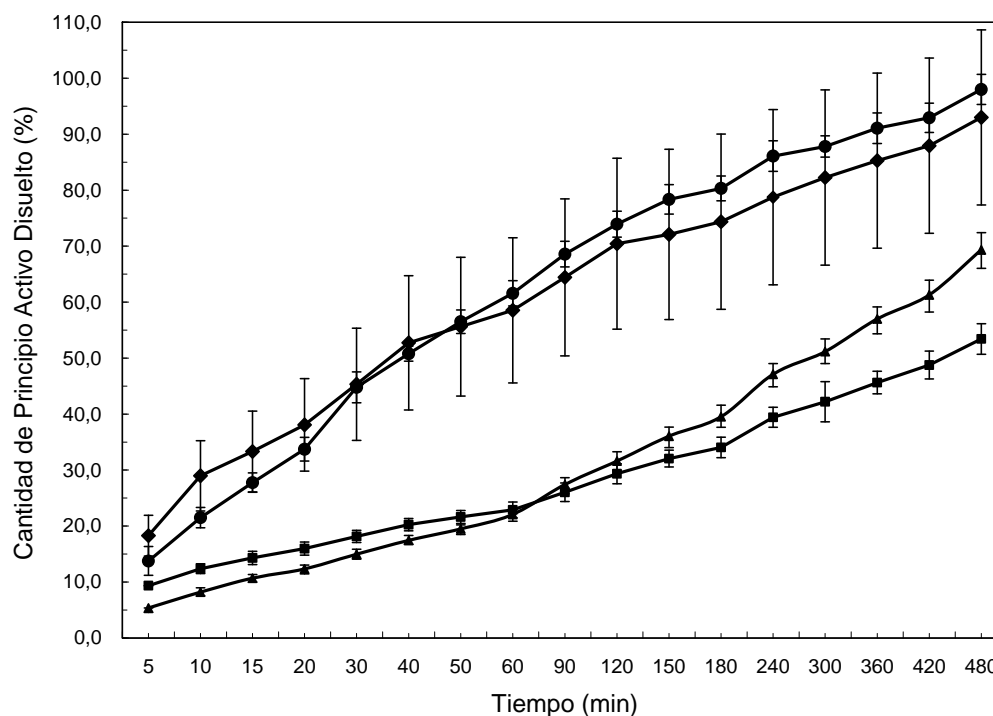


Figura III.6.5. Perfiles de disolución de cápsulas conteniendo P-I (●), P-II (▲), P-III (■), polvo del comprimido comercial (◆) en 900 mL de medio de disolución USP a pH 2,1. La escala de tiempo no es lineal con el fin de proveer una mejor visión de gráfico.

En resumen, cabe destacar que por medio de PCA-CR se lograron diferenciar los perfiles de disolución de cápsulas de distintos polimorfos de FUR, incluyendo a aquellos no diferenciables por métodos de comparación basados en los indicadores f , y se logró asignar el perfil de disolución de una forma farmacéutica comercial al de un polimorfo (P-I).

III.6.6. Clasificación de los Polimorfos Mediante el Uso de SOM

La utilización de SOM fue propuesta como una nueva alternativa para establecer la identidad del polimorfo de FUR contenido en una forma farmacéutica sólida. El conjunto de datos utilizados para el análisis por SOM fue el mismo que PCA-CR. Cada muestra estuvo representada por 12 cápsulas, las cuales fueron sometidas al ensayo de disolución en diversos días, con el fin de incorporar la variabilidad diaria al modelo.

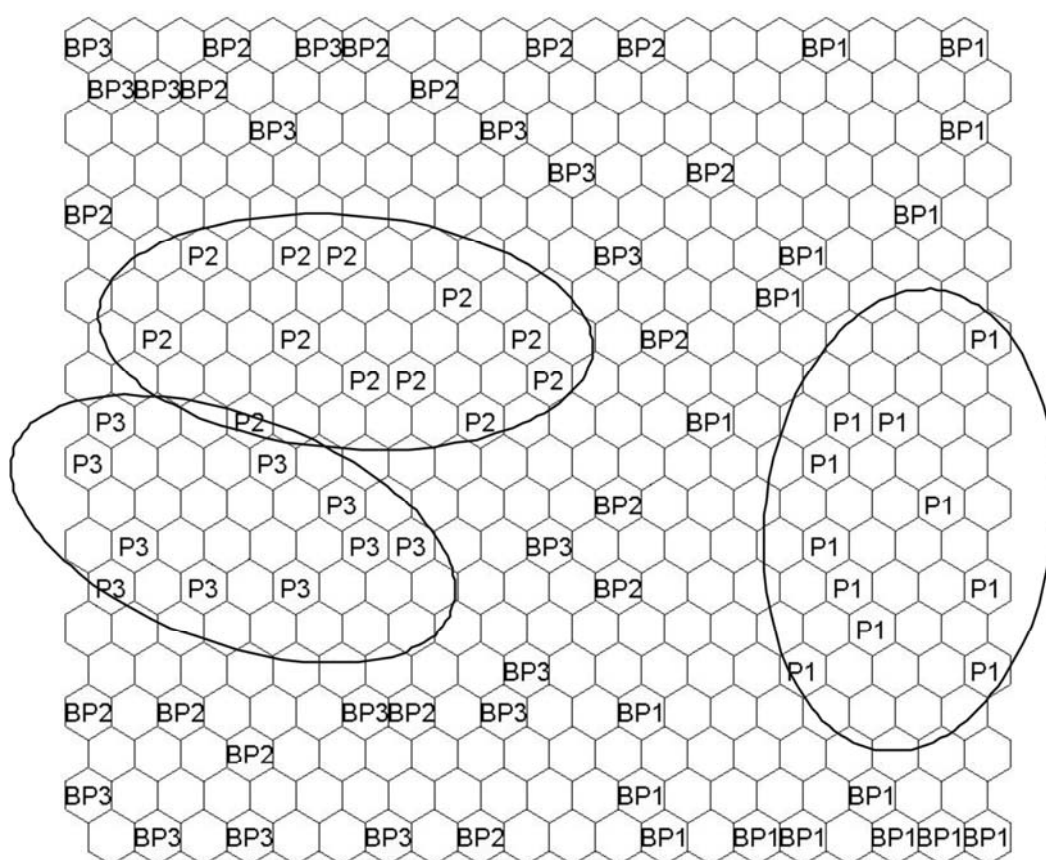


Figura III.6.5. Representación gráfica del SOM de los perfiles de disolución de cápsulas conteniendo los polimorfos P-I (P1), P-II (P2) y P-III (P3) de FUR y las correspondientes elipses correspondientes a las zonas $f_2=50$ (BP1-3) obtenidas mediante la técnica de *bootstrapping*, para cada polimorfo. Las unidades dispuestas sobre la misma celda se muestran como un único dato.

Los mapas auto-organizables son capaces de disminuir el número de dimensiones de una observación al proyectarla sobre un plano bidimensional, el cual conserva regiones donde las muestras demuestran similitud. La Figura III.6.5 muestra claramente el SOM

representando las características de los perfiles de disolución de los polimorfos P-I P-II y P-III, los cuales resultaron ampliamente discriminados en el mapa, a pesar de la proximidad entre las muestras pertenecientes a P-II y P-III.

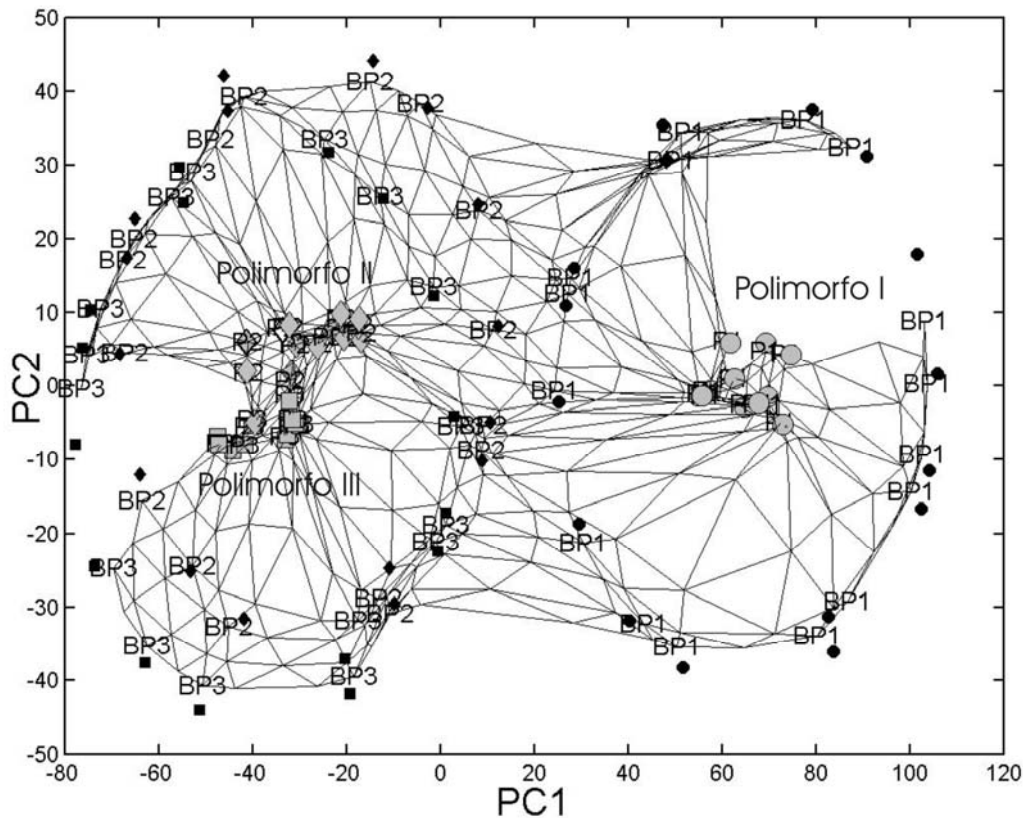


Figura III.6.6. Representación gráfica de las primeras dos PCs de las neuronas del mapa SOM de los perfiles de disolución pertenecientes a cápsulas conteniendo los polimorfos P-I (P1), P-II (P2) y P-III (P3) y región $f_2=50$ obtenida mediante técnicas de *bootstrapping* (BP1, BP2 y BP3, respectivamente) para cada polimorfo.

La técnica de *bootstrapping*, que permitió hallar la curva límite $f_2=50$ de cada polimorfo, muestra la laxitud del criterio f y su pobre capacidad de diferenciar los polimorfos P-I y P-II. En la Figura III.6.5 se evidencia además una congruencia con los resultados arrojados por el método PCA-CR en cuanto al distanciamiento de las formas P-II y P-III con respecto a P-I. Esta congruencia de observaciones entre los métodos SOM y PCA-CR puede ser analizada en detalle al observar la Figura III.6.6, tantos ponderados de los perfiles de disolución de las cápsulas fueron proyectados como valores tantos ponderados

correspondientes a los pesos de cada una de las neuronas.

Aunque el método SOM fue capaz de diferenciar los polimorfos, la implementación de una región de confianza estadística para el mismo fue vista como poco practicable. Este hecho hace prever que su aplicación con fines farmacéuticos podría verse dificultada.

III.6.7. Conclusiones

Se prepararon cápsulas conteniendo diferentes polimorfos de FUR y se estudiaron diferentes medios para su disolución, con el fin de determinar cuál sería el medio de disolución más apto para discriminar los polimorfos de FUR. Se construyeron perfiles de disolución levantados en un medio HCl/KCl, pH= 2,2 de las cápsulas conteniendo los polimorfos.

Se demostró que PCA-CR es eficaz para caracterizar los diferentes polimorfos a partir de sus perfiles de disolución, con un límite de confianza estadístico; si bien se trata de estudios preliminares, se avizora que esta estrategia podría llegar a constituirse en prácticamente el único método sencillo y de fácil aplicación, disponible para caracterizar polimorfos de un principio activo en productos farmacéuticos formulados.

Por otra parte, se aplicó la técnica de mapas auto-organizables de redes neuronales a la clasificación de polimorfos, por medio de la cual se lograron observar las similitudes y diferencias en el comportamiento de los tres polimorfos estudiados.

Los resultados arrojados por las metodologías SOM y PCA-CR fueron comparados, demostrando ser congruentes. Ambos métodos resultaron mucho más sensibles para la comparación de perfiles de disolución que los procedimientos basados en los indicadores *f*.

III.7. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE NUEVOS MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS PARA LA CARACTERIZACIÓN Y EL CONTROL DE CALIDAD DE ACEITE DE OLIVA VIRGEN MEDIANTE ESPECTROSCOPIA EN EL INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER

III.7.1. El Problema Analítico

La cuantificación de los distintos componentes grasos del VOO es muy importante desde el punto de vista del control de calidad y para la caracterización del mismo, así como también para una estimación de su estabilidad. El control del proceso de oxidación de los triglicéridos toma gran importancia para la preservación de los atributos positivos del VOO en el periodo comprendido entre la producción y la venta del mismo.¹³²

Los análisis de cuantificación de los distintos grupos de ácidos grasos, SFA, MUFA y de PUFA son generalmente realizados según el método oficial¹³³ mediante cGC-FID. Por otro lado, existen distintos métodos analíticos propuestos para la evaluación de la degradación oxidativa del VOO, entre ellos el más aceptado es la determinación del índice de peróxidos (PV), el cual determina la cantidad de productos primarios de oxidación, a través de una volumetría redox.

Estos métodos no siempre son sencillos de llevarse a cabo y también consumen mucho tiempo, requieren una cuidadosa preparación de la muestra y hacen uso de instrumentos sofisticados (GC) y de elevado costo y complejidad, los cuales no siempre se encuentran disponibles en todos los laboratorios de control de calidad.

Siendo simples, económicos y rápidos, los métodos analíticos espectrofotométricos constituyen una alternativa muy conveniente. La espectroscopia FTIR es una técnica que por lo general no requiere pre-tratamiento de la muestra. Debido a que todos los triglicéridos componentes de SFA, MUFA Y PUFA, como la mayoría de los compuestos orgánicos, poseen un grupo de señales particulares en su espectro en el IR, esta espectroscopia fue

propuesta como una herramienta de potencial utilidad para la determinación rápida de los parámetros anteriormente mencionados y del PV.

Sin embargo, la característica común a todos los compuestos orgánicos presentes en la muestra de exhibir señales en las mismas regiones del infrarrojo dificultaría la determinación de los índices o los analitos en una matriz compleja. La calibración multivariada es un instrumento útil para el análisis de mezclas multi-componentes, como lo es un aceite natural, porque permite la determinación rápida y simultánea de los componentes individuales, sin necesidad de separaciones físicas previas a partir de datos espectrales de las mismas. Por ello, se conjeturó que el problema de cuantificación podría ser resuelto mediante la aplicación de algoritmo PLS.

La espectroscopia FTIR ha sido utilizada para determinar un buen número de índices del aceite de oliva, como acidez,²¹⁵ índice de peróxidos²¹⁶ e índice de yodo.²¹⁷ La espectroscopia FTIR también fue empleada para determinar la estabilidad oxidativa²¹⁸ y la autenticidad de dichos aceites.²¹⁹ Además, por su elevado desempeño, los métodos espectroscópicos son aptos para procesos en línea o al lado de la línea de producción, permitiendo el control rápido y exacto de los diversos pasos de producción.

III.7.2. Objetivos Analíticos

Se estudió el empleo de la espectroscopia ATR-FTIR, en combinación con metodologías de calibración multivariadas para la evaluación de parámetros de calidad fundamentales del aceite de oliva virgen, incluyendo el índice de peróxidos y la composición de ácidos grasos.

Para alcanzar dicho objetivo, una serie de muestras de aceite de oliva virgen, provenientes de distintas regiones de Italia, producidos durante dos temporadas de cosecha, fue analizada por métodos oficiales y tomada luego como referencia para el desarrollo del

método propuesto ATR-FTIR. Este método podría representar una herramienta de reconocimiento fácil, apto y oportuno para supervisar la frescura del aceite de oliva, ya que se caracteriza por su simplicidad y facilidad operativa, no requiriendo de preparación de la muestra.

Los espectros ATR-FTIR de las muestras de aceite de oliva se muestran en la Figura III.7.1a. Los aceites poseen diferentes patrones de sustitución, diferenciándose también en la longitud de la cadena acíclica, así como en el grado de insaturación y la posición de la misma. Guillén y Cabo⁶¹ han listado una serie de bandas y hombros de absorción en el IR de algunos aceites comestibles y su asignación tentativa a diferentes grupos funcionales. Dichos autores también comentaron que la región de interés en el IR para caracterizar el perfil de TFA se encuentra entre 3100 y 700 cm^{-1} ; además, estos autores atribuyeron la banda débil localizada en 3444 cm^{-1} al estiramiento “O-H” del grupo hidroperóxido.

En vista de lo anteriormente mencionado y en relación con el objetivo de este trabajo, los intervalos de calibración para el perfil de TFA y para PV seleccionados fueron 3033 – 700 cm^{-1} y 4000 – 700 cm^{-1} , respectivamente (Figura III.7.1a). Sin embargo, puesto que las diferencias espectrales entre muestras en estas regiones no son fácilmente perceptibles mediante inspección visual, se hizo esencial un análisis multivariado para tener acceso a la información cuantitativa requerida.

III.7.3. Corrección y Pre-tratamiento de Datos Espectrales FTIR

Para realizar el análisis de perfil de TFA, la región comprendida entre 2400 y 2280 cm^{-1} fue suprimida antes de realizar los cálculos debido a su baja relación señal/ruido y a la presencia de fluctuaciones no atribuibles a la composición de las muestras.²²⁰ Para la cuantificación de los componentes del perfil de TFA, la región entre 4000 y 3033 cm^{-1} también fue eliminada ya que no contiene información química útil para alcanzar el objetivo

propuesto. En consecuencia, para el análisis se consideraron 1422 puntos por espectro, incluyendo los intervalos comprendidos entre 3033 y 2400 cm^{-1} y entre 2260 y 700 cm^{-1} . Los datos fueron centrados en la media antes del cálculo.

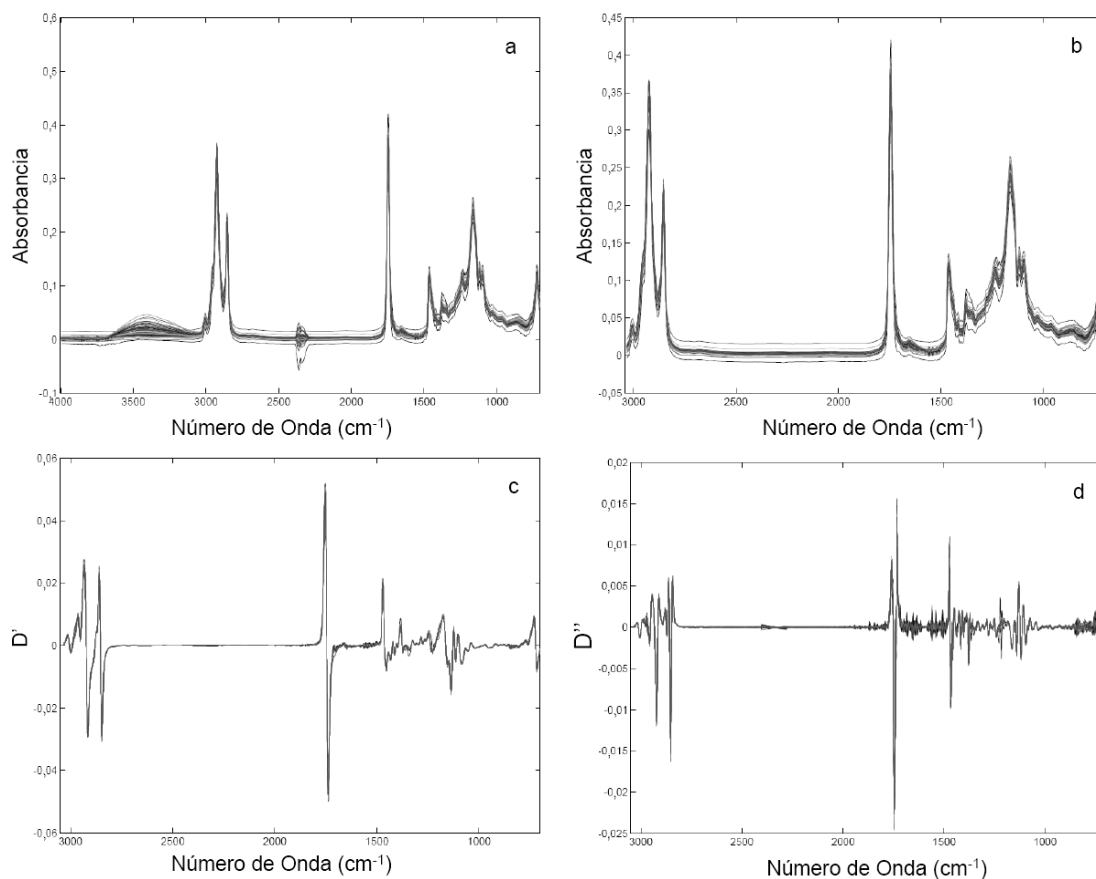


Figura III.7.1. a) Espectro completo (4000 – 600 cm^{-1}); b) espectro seleccionado para el análisis de TFA (3100 – 700 cm^{-1}); c) primera derivada y d) segunda derivada del espectro completo.

Por otra parte, para la determinación de PV se tomó el espectro completo y su primera derivada fue empleada para mejorar el funcionamiento del método. Las derivadas de los espectros fueron centradas en la media antes del análisis.

III.7.4. Modelos PLS para el Perfil de TFA

Para predecir el perfil de TFA (MUFA, PUFA y SFA) en VOO, se construyeron los tres modelos de calibración multivariante correspondientes por medio del algoritmo de mínimos

cuadráticos parciales, usando los datos espectrales pre-procesados. El número apropiado de LVs de cada modelo fue hallado aplicando el criterio estadístico de Haaland y Thomas ($\alpha=0,75$).¹⁰⁵

Como se muestra en la Tabla III.7.1, valores bajos de RMSD y del porcentaje del error relativo en la calibración REC (%), que miden el error promedio del análisis y evalúan la calidad de ajuste de los datos de calibración a los modelos desarrollados, fueron obtenidos para todos los modelos.

Además, buenos valores de r^2 , bajos niveles para los límites de cuantificación (LOQ) y cifras de mérito satisfactorias, evidenciaron la calidad de los modelos y la conveniencia del método para las determinaciones propuestas.

Tabla III.7.1. Parámetros críticos de la calibración de la determinación de MUFA, PUFA y SFA mediante FTIR-PLS.

Parámetro de interés	MUFA	PUFA	SFA
Intervalo espectral (cm^{-1})	3033 – 2400 + 2260 – 700		
Intervalo lineal (% de VOO)	64 – 81	13 – 20	6 – 16
Número de factores (LVs)	14	15	13
Número de muestras de entrenamiento (N)	61	61	61
PRESS	10,59	2,52	6,11
RMSD (%)	0,42	0,20	0,32
REC (%)	0,56	2,23	1,95
r^2	0,99	0,99	0,96
Selectividad	0,17	0,20	0,14
Sensibilidad (SEN)	0,0009	0,0015	0,0020
Sensibilidad analítica [$\gamma= (\text{SEN}/\sigma_o)$]	0,17	2,07	0,32
Mínima concentración diferenciable (% de VOO)	6,0	0,48	3,17
Límite de detección (LOD, % en VOO)	3	0,28	1,3
Límite de cuantificación (LOQ, % en VOO)	10	0,94	4,5

Asimismo, en la etapa de validación se observaron recuperaciones casi cuantitativas

para los tres parámetros estudiados (100, 103 y 98% para MUFA, PUFA y SFA, respectivamente) y desviaciones estándar relativas inferiores al 6%. Los resultados obtenidos se ilustran en las Figuras III.7.2.A, III.7.2.B y III.7.2.C, respectivamente, mostrando un buen acuerdo entre los niveles predichos y reales de MUFA, PUFA y SFA en los conjuntos de validación.

Tabla III.7.2. Resultados de la validación de la determinación de MUFA, PUFA y SFA mediante FTIR-PLS.

Parámetro de interés	MUFA	PUFA	SFA
Número de muestras de validación (<i>N</i>)	25	25	25
Recuperación (%)	100	103	98
Error relativo de la predicción (REP, %)	1	4	6
r^2	0,89	0,98	0,71
Ordenada al origen \pm SD ($y_0 \pm$ SD)	5 ± 5	$0,4 \pm 0,2$	5 ± 1
Pendiente \pm SD	$0,93 \pm 0,07$	$0,98 \pm 0,03$	$0,7 \pm 0,1$

Las pendientes y ordenadas al origen de las curvas correspondientes obtenidas resultaron cercanas a la unidad y al cero, respectivamente, indicando un bajo error de tendencia y la ausencia de errores de regresión sistemáticos (Tabla III.7.2).

Un procedimiento similar fue implementado para la determinación del contenido de ácido oleico (OA) y el tenor de ácido linoleico (LA). Los modelos de calibración fueron construidos utilizando los datos espectrales previamente procesados.

El modelo PLS y sus parámetros críticos, incluyendo RMSD, REC y el número de factores o variables latentes conservados, se encuentran detallados en la Tabla III.7.3.

La validación de los modelos PLS para OA y LA fue realizada sobre el mismo conjunto independiente de validación. Excelentes recuperaciones y errores de predicción (1% y 7% para OA y LA, respectivamente), fueron obtenidos cuando 13 y 14 LVs fueron utilizadas, respectivamente, demostrando una alta reducción de la dimensionalidad.

Tabla III.7.3. Parámetros críticos de la calibración de la determinación de OA y LA.

Parámetro de interés	Acido Oleico	Acido Linoleico
Intervalo Espectral (cm^{-1})	3033 – 2400 + 2260 – 700	
Intervalo Lineal (% en VOO)	62 – 80	5 – 15
Número de factores (LVs)	14	13
Número de muestras de entrenamiento (N)	61	61
PRESS	10,88	9,33
RMSD (%)	0,42	0,39
REC (%)	0,51	4,64
r^2	0,99	0,98
Selectividad	0,18	0,20
Sensibilidad (SEN)	0,0009	0,0016
Sensibilidad Analítica [$\gamma = (\text{SEN}/\sigma_o)$]	0,18	1,17
Mínima diferencia de concentración (%)	5,6	0,9
Límite de detección (LOD, % en VOO)	3	0,5
Límite de cuantificación (LOQ, % en VOO)	10	1,7

Por su parte, el bajo sesgo del método y la ausencia de errores sistemáticos fueron demostrados por los valores de las pendientes y las ordenadas al origen de las rectas de regresión de la representación de las concentraciones reales frente a las predichas (Figuras III.7.2.D y III.7.2.E). En ambos casos se obtuvieron valores cercanos a la unidad y al cero, respectivamente (Tabla III.7.4).

Tabla III.7.4. Resultados de la validación de las determinaciones de OA y LA mediante el método FTIR-PLS.

Parámetro de interés	Acido Oleico	Acido Linoleico
Número de muestras de validación (N)	25	25
Recuperación (%)	100	98
REP (%)	1	7
r^2	0,92	0,94
Ordenada al origen (y_o)	4 ± 4	$0,1 \pm 0,4$
Pendiente	$0,94 \pm 0,06$	$0,96 \pm 0,05$

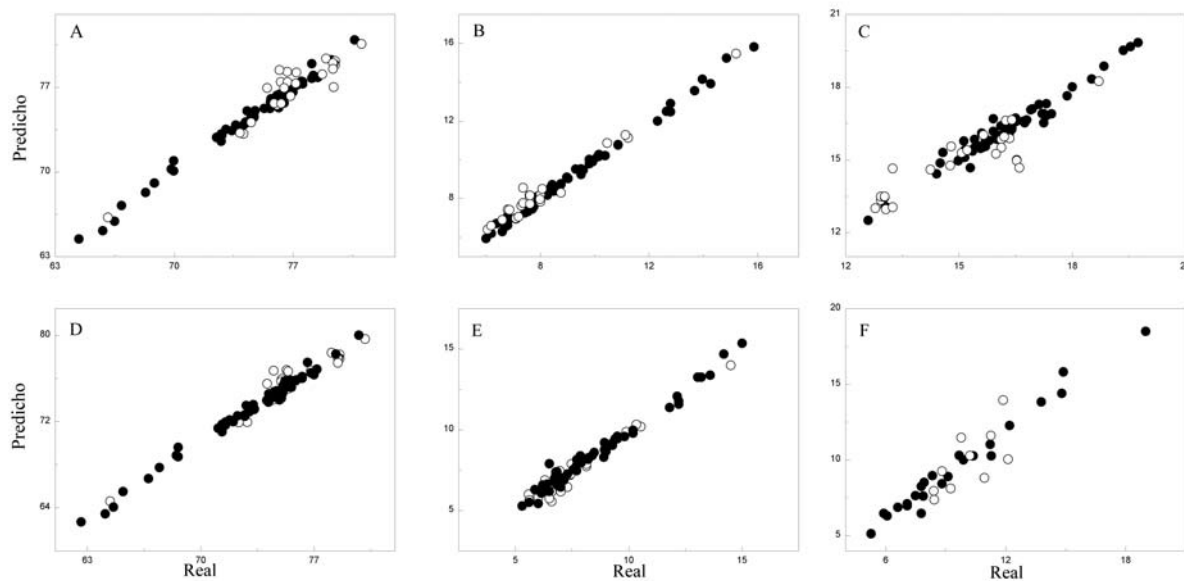


Figura III.7.2. Valores predichos por medio de FTIR-PLS frente a valores de referencia (“real”, obtenidos mediante análisis cGC-FID) en los conjuntos de calibración (●) y validación (○) para MUFA (A), PUFA (B), SFA (C), OA (D) y LA (E). También se muestra la correlación entre el índice de peróxidos predicho por FTIR-PLS y valores obtenidos por el método tritrimétrico (F), en los conjuntos de calibración (●) y validación (○).

III.7.5. Modelo PLS para la Determinación de PV

Para predecir el PV en VOO, diferentes modelos de calibración de PLS fueron construidos empleando los espectros completos y reducidos, en intervalos espectrales obtenidos empleando la estrategia de ventana móvil.¹¹² Sin embargo, ninguno de estos modelos proporcionó una calibración aceptable, proveyendo además predicciones insatisfactorias.

Debido a esto, se exploró el empleo de espectroscopia de derivadas, haciendo uso de la primera (D') y la segunda (D'') derivada espectral como pretratamiento de los datos. La Tabla III.7.5 lista los parámetros de la calibración y predicción de los modelos generados usando espectros normales y espectros derivados.

Se observó que, en contraste con el empleo de espectros normales, los modelos basados en D' y D'' dieron lugar a calibraciones satisfactorias, evidenciando coeficientes de correlación muy buenos y bajos valores de RMSD; más aún, las predicciones también fueron

muy satisfactorias (Figura III.7.2.F), en términos de REP (%) y valores de recuperación.

Tabla III.7.5. Calibración y validación de la determinación FTIR-PLS del PV, utilizando Espectro normal (D^0), Primera derivada (D') y Segunda derivada (D'').

Parámetro	D^0	D'	D''
<i>Calibración</i>			
Intervalo de calibración ($\text{meqO}_2 \text{ kg}^{-1}$ aceite)	5,7 – 15,7	5,7 – 15,7	5,7 – 15,7
Número de factores (LVs)	5	10	7
Número de muestras de entrenamiento (N)	23	24	24
PRESS ($\text{meqO}_2 \text{ kg}^{-1}$ aceite) ²	174,66	152,35	191,32
RMSD ($\text{meqO}_2 \text{ kg}^{-1}$ aceite)	1,4302	0,6933	0,9482
REC (%)	15,6	7,2	9,9
r^2	0,8040	0,9759	0,9446
Selectividad	1,0	0,35	0,55
Sensibilidad (SEN)	0,0044	0,0001	0,0001
Sensibilidad Analítica [$\gamma = (\text{SEN}/\sigma_0)$]	1,2	1,1	1,1
Mínima diferencia de concentración ($\text{meqO}_2 \text{ kg}^{-1}$ aceite)	0,8	0,9	0,9
Límite de detección (LOD, $\text{meqO}_2 \text{ kg}^{-1}$ aceite)	3,1	1,0	1,6
Límite de cuantificación (LOQ, $\text{meqO}_2 \text{ kg}^{-1}$ aceite)	10,3	3,4	5,2
<i>Validación</i>			
Número de muestras de validación	10	10	10
Recuperación (%)	75	98	96
REP (%)	24	14	12

III.7.6. Conclusiones

Se desarrolló una estrategia espectroscópica con asistencia quimiométrica de tipo ATR-FTIR-PLS para la evaluación de diversos parámetros de calidad del aceite de oliva virgen. En la determinación del perfil de TFA, se obtuvieron muy buenos resultados para PUFA, MUFA y SFA mediante el empleo de espectros normales pulidos.

Este enfoque demostró ser más apropiado que la alternativa de seleccionar una región

espectral por medio de la estrategia de ventana móvil de ancho variable. El mismo proveyó resultados satisfactorios para la determinación del tenor de ácido linoleico, proporcionando resultados excelentes para la cuantificación de ácido oleico [Recuperación= $(100 \pm 1)\%$].

Además, se demostró que la mejor capacidad predictiva para PV fue alcanzada cuando la construcción del modelo PLS se realizó empleando la primera derivada de los datos espectrales, centrada en la media. No se observaron errores sistemáticos y/o de tendencia en la predicción de las muestras de calibración y los modelos de calibración se caracterizaron por cifras de mérito satisfactorias.

El método propuesto es rápido y se caracterizó por su elevada capacidad de procesamiento de muestras, proporcionando resultados con apropiada exactitud y precisión mediante el empleo de un único espectro por muestra. El mismo no requirió pre-tratamiento de la muestra y es poco agresivo para el medio ambiente, ya que el consumo de elementos contaminantes es mínimo y la producción de residuos que deben descartarse se encuentra extremadamente reducida.

III.8. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS ELECTROQUÍMICOS QUIMIOMÉTRICAMENTE ASISTIDOS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ANTI-OXIDANTES EN EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN. ESTUDIOS PRELIMINARES

III.8.1. El Problema Analítico

Los tocoferoles, comúnmente agrupados bajo la denominación de Vitaminas E, se encuentran entre los principales antioxidantes fenólicos presentes en el aceite de oliva. El α -tocoferol (TOC) es uno de los tocoferoles más abundantes en VOO (Figura III.8.1). Por su parte, el tirosol (TSL) es un antioxidante fenólico que a pesar de no ser tan potente como otros antioxidantes presentes en el aceite de oliva, su alta concentración y su buena biodisponibilidad indican que puede tener un efecto global importante.¹³⁷

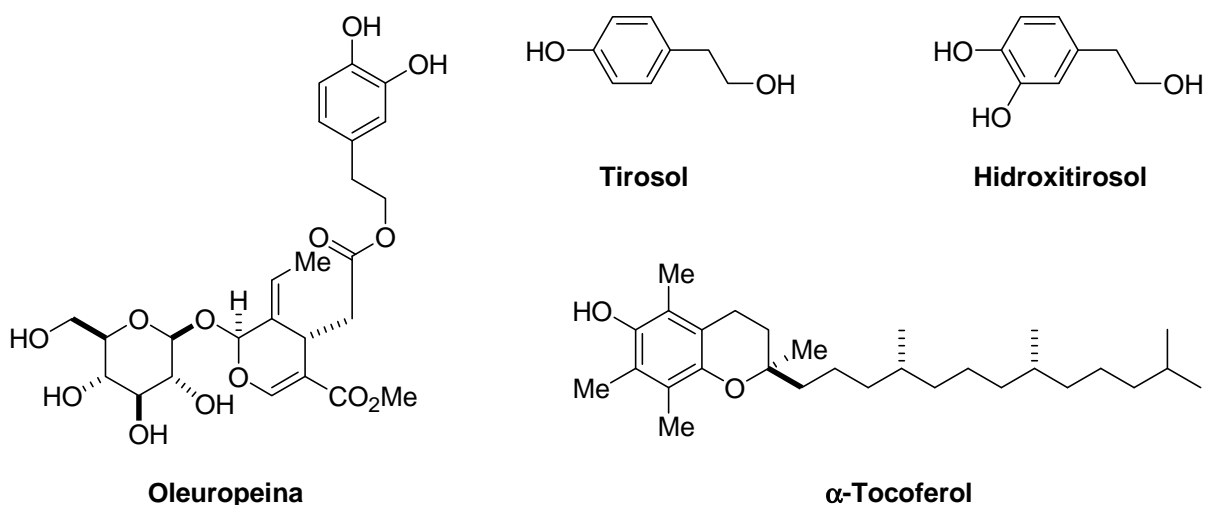


Figura III.8.1. Estructuras químicas de compuestos antioxidantes del VOO, incluyendo α -tocoferol, tirosol, hidroxitirosol y oleuropeina.

El hidroxitirosol (HTSL) es uno de los antioxidantes más poderosos del VOO, hallándose en el mismo en su forma simple y como un éster del ácido elenólico, la oleuropeina. Ambos compuestos son unos de los responsables del gusto amargo del aceite de oliva virgen.

Varios métodos han sido publicados acerca de la determinación de tocoferoles en productos alimenticios. La revisión de Bramley y col. se encuentra entre las más recientes.²²¹

La mayor parte de procedimientos publicados requiere una muy larga y tediosa preparación de la muestra. El análisis puede incluir una etapa de saponificación y la posterior extracción de la fracción insaponificable con el fin de aislar los tocoferoles, una extracción directa de los lípidos, o dilución simple en el caso de los aceites.²²² Finalmente, se realiza una colorimetría, que permite determinar el contenido de tocoferol total, como en el método de Emmerie-Engel.²²³

Sin embargo, los ensayos de los tocoferoles individuales por lo general son llevados a cabo empleando CCD, GC o CLAE.^{222,224} También han sido utilizadas estrategias voltamétricas para la cuantificación diferencial de tocoferoles en aceites de oliva, haciendo uso de sus propiedades electroquímicas y utilizando la quimiometría para resolver sus señales.²²⁵

Por otro lado, el TSL y HTSL son los principales compuestos fenólicos en el VOO donde su actividad antioxidante está directamente correlacionada con las concentraciones de estos compuestos, de acuerdo a diversos autores.²²⁶ Aunque varios métodos de extracción de la fracción polar del aceite de oliva han sido comparados en trabajos previos,²²⁷ para este fin es comúnmente utilizada una simple y rápida extracción líquido-líquido, empleando metanol/n-hexano como solventes.²²⁸

Metodologías de CCD, RMN y especialmente CLAE también han sido utilizadas con este propósito; siendo la última capaz de proveer el perfil fenólico de VOO.²²⁹ Estas técnicas analíticas necesitan generalmente complejos protocolos de preparación de muestras y un importante tiempo de desarrollo, especialmente en el caso de CLAE. Por otro lado la electroforesis capilar también ha probado ser una estrategia válida y realizable como herramienta de análisis, especialmente para la determinación de compuestos fenólicos.²³⁰

Una estrategia interesante utilizada para determinar las fracciones fenólicas después de

la extracción con una solución reguladora de glicina consistió en emplear un sensor impreso desechable (SPE) acoplado a detección mediante DPV, utilizando oleuropeina, el éster de HTSL, como compuesto de referencia. También fue utilizado un biosensor basado en tirosinasa, empleando una sonda amperométrica de oxígeno como transductor de la señal.²³¹

Sin embargo la mayoría de estas técnicas requiere de una extracción previa, como se ha mencionado anteriormente, y la utilización de equipos sofisticados y/o costosos en algunos casos, o el empleo de reacciones de color poco específicas que no discriminan entre las distintas fracciones de un grupo de componentes similares.

La DPV ha resultado ser una técnica muy utilizada para cuantificar este tipo de compuestos con propiedades redox debido a su bajo costo, rápida implementación y sencillez del procedimiento, por lo que se supuso que sería una opción válida para alcanzar el objetivo propuesto.

En la Figura III.8.2 se muestran los voltamogramas DPV, correspondientes a soluciones no acuosas de TOC, TSL, HTSL y OLE en la relación aproximada de concentraciones presentes en el VOO. Se puede observar que TOC, HTSL y OLE presentan actividad electroquímica en el intervalo de potenciales de 0,150 – 0,500 V con una amplia variedad de intensidades de corriente, por lo cual resultaría imposible cuantificar estos analitos de forma exacta y precisa en dicho intervalo por medio de un modelo uni-variado.

A esto se suma que en la región de 0,500 – 0,800 V existe una importante deriva de la línea de base la cual convierte al método en un proceso muy dependiente de las condiciones experimentales y por lo tanto poco robusto.

Cabe destacar además que el grupo electro-activo para OLE y HTSL es el mismo (Figura III.8.1), siendo imposible su resolución por la técnica voltamétrica; por lo tanto, ambos deberían ser cuantificados conjuntamente como HTSL, representando el resultado la contribución del grupo catecol.

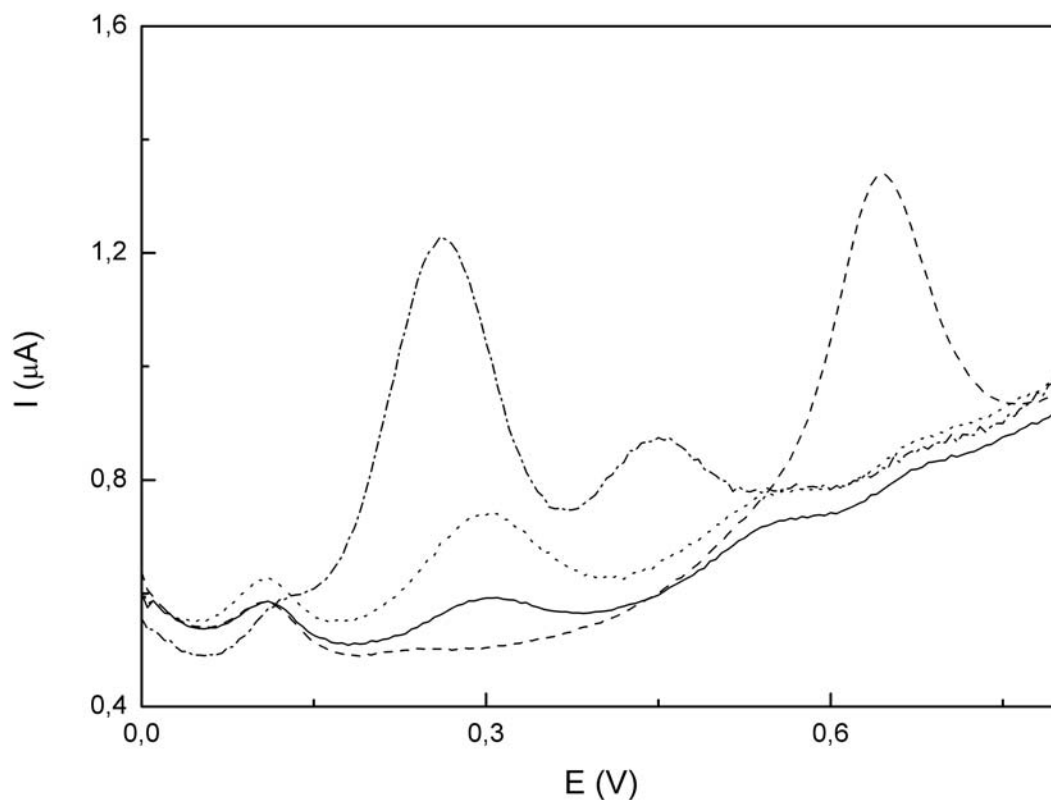


Figura III.8.2. Voltamogramas obtenido mediante la técnica DPV, pertenecientes a soluciones conteniendo 15 ppm TOC (— · —), 3 ppm TSL (--), 2 ppm HTSL (····) y 5 ppm OLE (—).

Debido a esto nos dispusimos a desarrollar, optimizar y validar métodos multivariados de tipo PLS-DPV para cuantificar el contenido de oleuropeina, tirosol, hidroxitirosol y α -tocoferol en VOO.

Para poder determinar simultáneamente los analitos sin que ello requiera separación previa o diluciones especiales de la muestra para cada analito, y utilizando el mismo método de medición electroquímica, se planificó llevar a cabo las siguientes actividades:

- Optimizar la metodología de medición electroquímica. Hallar condiciones instrumentales y de medio de disolución apropiadas.
- Estudiar el pre-tratamiento de datos a realizar. Analizar estrategias para la corrección de la deriva de línea de base, el corrimiento de picos y el ruido instrumental.
- Seleccionar las variables (intervalo de potenciales) a utilizar para realizar la calibración.

III.8.2. Optimización de las Condiciones de Medida Electroquímica

Las condiciones de medida para el método electroquímico fueron optimizadas a partir de las condiciones publicadas por Galeano Díaz y col. para la cuantificación de tocoferoles.²²⁵ En la técnica electroquímica utilizada DPV, se empleó un sistema de tres electrodos, consistente en un electrodo de referencia de Ag/AgCl-3M KCl, un electrodo de hilo de platino como electrodo de control, y un electrodo de carbono vítreo de 3 mm de diámetro que ofició de electrodo de trabajo.

Las determinaciones se realizaron en un medio no acuoso con el fin de evitar la extracción de los analitos. El electrolito consistió de una solución de H₂SO₄ 0,2 M en hexano:etanol (40:60), al que se adicionó acetato de tetrabutilamonio hasta una concentración final de 0,06 M. En su configuración óptima, los parámetros de configuración del equipo para la determinación conjunta de los analitos incluyeron el intervalo 0,000 – 0,800 V, con adquisición cada 0,005 V a una velocidad de barrido de 0,005 V/s y un potencial de pulso de 0,06 V.

III.8.3. Diseño del Conjunto de Calibración. Optimización de Parámetros Estadísticos de la Calibración

En una primera etapa se verificó la relación lineal entre la intensidad de corriente y la concentración en el intervalo de potencial 0,000 – 0,800 V para los analitos en el rango de concentraciones de trabajo. Los intervalos de potencial donde se encontró una muy buena correlación fueron 0,175 – 0,375 V para el α -tocoferol, 0,480 – 0,800 V para TSL y 0,175 – 0,425 V para el HTSL.

En vista que el objetivo principal del trabajo era procurar la cuantificación de los antioxidantes presentes en el VOO, se preparó un conjunto de 20 mezclas de calibración de los analitos, cuyas concentraciones fueron seleccionadas siguiendo un diseño central compuesto a tres factores, según se detalla en la Tabla III.8.1.

Tabla III.8.1. Conjunto de calibración para el análisis simultáneo mediante DPV-PLS de TOC, TSL y HTSL. Concentraciones expresadas en ppm.

Solución N°	TOC	TSL	HTSL	Solución N°	TOC	TSL	HTSL
1	7,40	0,94	0,43	11	10,1	0,78	0,60
2	12,8	0,94	0,43	12	10,1	1,57	0,60
3	7,40	1,41	0,43	13	10,1	1,18	0,32
4	12,8	1,41	0,43	14	10,1	1,18	0,88
5	7,40	0,94	0,77	15	10,1	1,18	0,60
6	12,8	0,94	0,77	16	10,1	1,18	0,60
7	7,40	1,41	0,77	17	10,1	1,18	0,60
8	12,8	1,41	0,77	18	10,1	1,18	0,60
9	5,57	1,18	0,60	19	10,1	1,18	0,60
10	14,6	1,18	0,60	20	10,1	1,18	0,60

Para simular la matriz oleosa se adicionó una cantidad fija de aceite de oliva previamente refinado, el cual contenía una concentración determinada de TOC que no pudo ser totalmente removida en el proceso de refinación, la cual fue tomada en cuenta al momento de calcular la concentración final en la solución. Los voltamogramas se obtuvieron por duplicado para cada solución de calibración con el fin de incorporar la variabilidad de la medición electroquímica en el modelo de calibración. Los mismos se muestran en la Figura III.8.3.

Para la cuantificación de TOC se corrió el algoritmo de selección de ventana móvil de ancho variable empleando el criterio de mínimo PRESS eligiéndose la zona del mínimo error y el número óptimo de factores para cada una siguiendo el criterio de la prueba F propuesto por Haaland y Thomas, para evitar un posible sobre-ajuste.¹⁰⁵

El mínimo PRESS fue alcanzado con un número de 5 LVs en el intervalo de 0,220 – 0,725 V. En la Tabla III.8.2 se encuentran los parámetros más relevantes de la calibración, junto con algunas de las cifras de mérito más importantes de la misma.

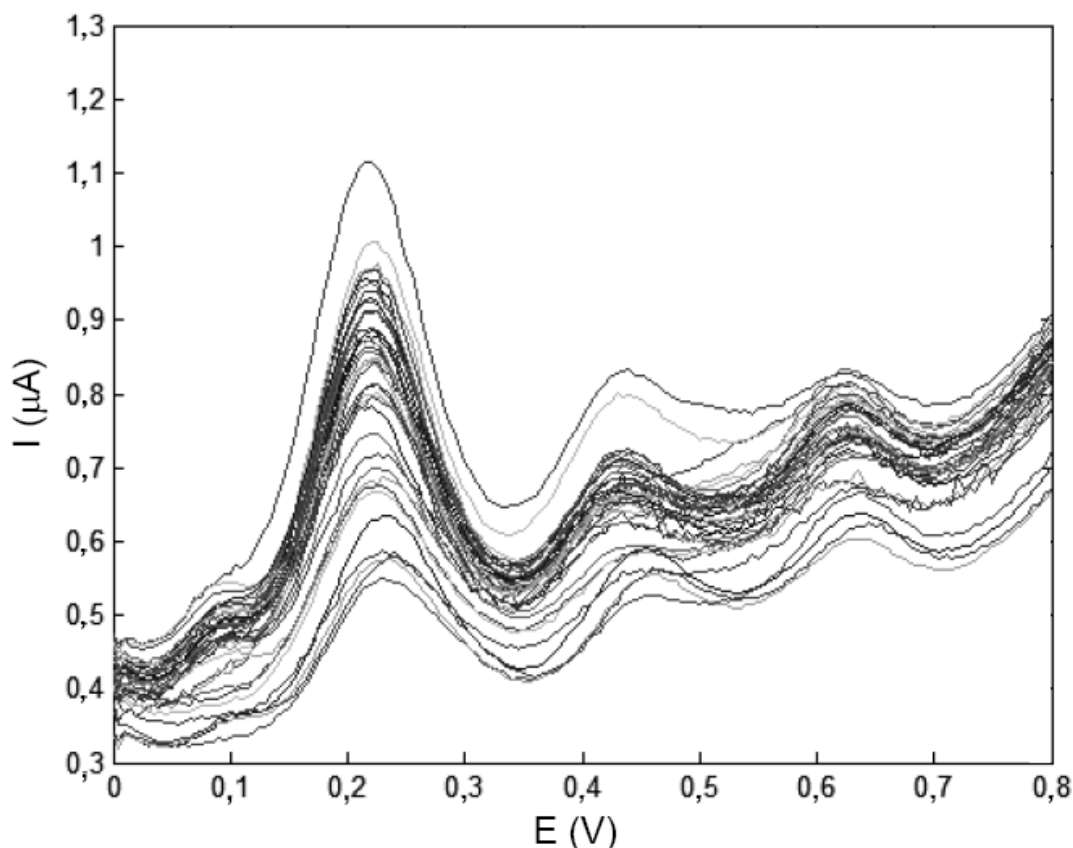


Figura III.8.2. Voltamogramas obtenidos por DPV correspondientes a las soluciones de calibración.

Por otro lado, se observó que la cuantificación de TSL a partir de sus voltamogramas sin pre-tratamiento no fue posible, debido a la existencia de un importante cambio en la línea de base en la región de interés. Para subsanar este inconveniente distintos pre-tratamientos de datos fueron utilizados, incluyendo derivación, variancia normal estándar, substracción de la línea de base, centrado en la media, etc.

De todos ellos, se vio que el más eficaz para los fines cuantitativos propuestos resultó ser la derivada segunda de los voltamogramas. La efectividad de esta transformación presenta base matemática, ya que la derivada segunda de una función lineal (suponiendo que la línea de base fuese recta) es equivalente a una función constante de valor $k=0$ independientemente de la función de partida, según puede corroborarse de las Ecuaciones III.18 – III.20, quedando

anulado el efecto de la diferente deriva en los voltamogramas.

$$f(x) = ax + b \quad [\text{III.18}]$$

$$f'(x) = a \quad [\text{III.19}]$$

$$f''(x) = 0 \quad [\text{III.20}]$$

La derivación fue llevada a cabo utilizando el algoritmo de Savitzky-Golay, donde el tamaño de la ventana de suavizado y derivación, establecida por medio de prueba y error, fue 0,105 V (21 sensores).

Tabla III.8.2. Parámetros de calibración PLS para TOC, TSL y HTSL y algunas de las cifras de mérito más importantes del modelo.

Parámetro	TOC	TSL	HTSL
Intervalo de potencial (V)	0,220 – 0,725	0,57 – 0,67	0,195 – 0,595
Intervalo lineal (ppm)	7,5 – 14,6 ^a	0,78 – 1,57	0,32 – 0,88
Nº de niveles de concentración	5	5	5
Pre-tratamiento de datos	-	D''	D'
Número de Variables Latentes (LVs)	5	6	9
RMSD (%)	0,4	0,072	0,042
Recuperación en el Calibrador (%)	100	100	100
SD (%)	9	5	6
r^2	0,83	0,87	0,93
LOD (mg L ⁻¹)	2,2	0,23	0,09
LOQ (mg L ⁻¹)	7,5	0,76	0,029

^aEl valor de LOQ fue tomado como límite inferior del intervalo lineal (<http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>).

Los parámetros más importantes de la calibración del TSL se muestran en la Tabla III.8.2, donde también puede evidenciarse la bondad del ajuste a partir de la evaluación de las cifras de mérito. El intervalo óptimo de potencial para la cuantificación fue obtenido mediante

la aplicación del algoritmo de ventana móvil de ancho variable, teniendo como criterio la minimización de PRESS.

Para cuantificar el HTSL, el pre-tratamiento de datos más apto fue la realización de la primera derivada de los datos que permitió subsanar los problemas de selectividad ocasionados por la presencia de TOC que se encuentra en la misma región del voltamograma y está presente en una relación de masas de por lo menos 7:1. La ventana de derivación seleccionada fue de 0,105 V (lo que equivale a 21 puntos o escalones del voltamograma).

Por su parte, las cifras de mérito de la calibración demostraron el buen ajuste de los datos al modelo PLS. De igual modo, el intervalo óptimo de potencial para la cuantificación fue obtenido mediante la aplicación del algoritmo de ventana móvil teniendo como criterio la minimización de PRESS.

III.8.4. Validación del Método Mediante el Uso de Muestras Sintéticas

La exactitud y la precisión del método propuesto fueron evaluadas utilizando un conjunto de 6 mezclas sintéticas distintas a las del conjunto de calibración. Se calculó el porcentaje de recuperación de cada analito para cada grupo, siendo en todos los casos no significativamente diferente al 100%, por lo que se puede afirmar que el método es exacto.

Tabla III.8.3. Resultados de exactitud y precisión del conjunto de muestras de validación para los tres analitos.

Validación	TOC	TSL	HTSL
Recuperación (%)	101	98	104
SD (%)	9	6	8
Niveles de concentraciones (ppm)	7,4 – 12,9	0,93 – 1,42	0,40 – 0,72
r^2	0,85	0,76	0,81

Por su parte, las desviaciones estándar de la predicción oscilaron entre 6 y 9%, lo cual

no resultaría del todo insatisfactorio, especialmente teniendo en cuenta la complejidad de la matriz y las ventajas del método en cuanto a su capacidad de analizar numerosas muestras en un período de tiempo acotado.

III.8.5. Conclusiones

Se desarrolló una estrategia electroquímica con asistencia quimiométrica de tipo DPV-PLS para la cuantificación de TOC, TSL y HTSL, presentes en VOO. Esta metodología permitiría la determinación de los antioxidantes catecólicos incluyendo oleuropeina, como compuestos catecólicos totales.

Tras verificar la relación lineal entre la intensidad de corriente y la concentración en el intervalo de potencial 0,000 – 0,800 V para los analitos en el rango de concentraciones de trabajo, se efectuó la selección del intervalo de potencial de los voltamogramas para la calibración de los diversos compuestos. La misma se realizó por medio de la estrategia de ventana móvil de ancho variable con criterio de minimización del PRESS; se empleó asimismo el criterio de Haaland y Thomas para elegir el número apropiado de variables latentes a emplear.

Se demostró que la mejor capacidad predictiva para TSL fue alcanzada cuando la calibración del modelo PLS se realizó empleando la segunda derivada de los datos espectrales, centrada en la media.

La validación se realizó con un conjunto de muestras sintéticas, donde los métodos propuestos demostraron ser exactos, razonablemente precisos y reproducibles. Los métodos desarrollados evidenciaron ser más rápidos y ambientalmente más amigables que las separaciones cromatográficas o extracciones con solventes que se requieren en los métodos tradicionales.

Este método demostró que presenta gran potencialidad para su futura aplicación a la

determinación de compuestos antioxidantes en muestras reales de una gran variedad de sustancias grasas.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES FINALES

CAPÍTULO IV:

CONCLUSIONES FINALES

La Quimiometría es una sub-disciplina de la Química que tomó gran impulso recientemente, como consecuencia del extraordinario desarrollo experimentado por la informática y la computación. Esta rama de la Química utiliza de forma lógica las matemáticas, la estadística y otros métodos para diseñar o seleccionar procedimientos óptimos de medida y experimentación y para extraer la información más relevante de los datos experimentales.

El objetivo de este trabajo de Tesis fue el estudio de la incorporación de algunos métodos quimiométricos como elementos clave en el desarrollo de metodologías analíticas rápidas, económicas y de gran flujo de muestras, útiles para el control de calidad de productos de interés farmacéutico, incluyendo excipientes y especialidades medicinales.

Las metodologías desarrolladas se basaron en la extracción de información analítica mediante métodos quimiométricos a partir de datos espectroscópicos (Ultravioleta-Visible e Infrarrojo Medio) y de perfiles de disolución.

También se llevaron a cabo estudios quimiométricos preliminares sobre voltamogramas obtenidos a partir de la aplicación de técnicas de voltametría diferencial de pulso sobre mezclas complejas.

Como pre-procesamiento de los datos se utilizó el centrado en la media, acompañado de la derivación espectral sólo en los casos en que esta última demostró dar lugar a resultados más confiables que los provistos por los espectros normales originales.

Los métodos quimiométricos que se utilizaron para efectuar análisis cuantitativos fueron

Regresión sobre Componentes Principales (PCR), Derivada de la Razón Espectral (DRE) y especialmente el algoritmo de Mínimos Cuadrados Parciales con una única variable dependiente (PLS).

En conjunción con los métodos multivariados, se utilizó una estrategia de selección de sensores, que permitió mejorar la calidad de los modelos y sus correspondientes capacidades predictivas.

La aptitud de los diferentes modelos de calibración utilizados con fines cuantitativos se demostró mediante actividades de validación apropiadas, las que se efectuaron tanto a nivel interno, utilizando la estrategia de dejar uno afuera, como a nivel externo. Para lograr este último cometido, se emplearon muestras sintéticas y se determinaron los parámetros fundamentales de los métodos, incluyendo la exactitud y la precisión en el intervalo lineal de concentraciones de trabajo, la estabilidad de la calibración en el tiempo, como así también la sensibilidad, la selectividad y los límites de detección y cuantificación, entre los más relevantes.

Los métodos analíticos desarrollados y validados se aplicaron al control de dosis (valoración), a la evaluación del ensayo de disolución en la modalidad oficial (unipuntual, a tiempo fijo) y a la elaboración de perfiles de disolución de comprimidos de las diferentes asociaciones farmacológicas estudiadas, empleando muestras comerciales reales.

Específicamente, y en cumplimiento de los objetivos de esta Tesis, se efectuaron los estudios que se detallan a continuación, junto a sus respectivas conclusiones:

- Se desarrolló y validó un nuevo método analítico para la determinación simultánea de Acetaminofeno (ACE) y Diclofenaco (DIC) en muestras sintéticas y productos formulados farmacéuticos sólidos. El procedimiento propuesto se basó en el análisis por PLS de espectros adquiridos en el UV, permitiendo tanto el control de dosis de comprimidos de ACE y DIC mediante la determinación simultánea de ambos analitos, así como la

construcción de perfiles de disolución para cada principio activo de la combinación farmacéutica estudiada, a pesar del amplio solapamiento espectral que presentan y la notable desproporción de relación entre las masas de los principios activos en la asociación farmacológica.

El método propuesto requiere un mínimo pre-tratamiento de las muestras y utiliza solventes y equipamiento más accesibles y menos costosos que un método cromatográfico típico, sumándole a estas ventajas su mayor agilidad y velocidad.

- Se desarrolló y validó un método analítico multivariado conveniente para la determinación simultánea de Clorhidrato de Pseudoefedrina (PEF) y Clorhidrato de Fexofenadina (FEX) en muestras sintéticas binarias, basado en la aplicación de metodología UV-PLS. Esta técnica simple requiere instrumentación sencilla y tiene un menor número de pasos con respecto a los métodos existentes. Además, de acuerdo con los resultados de validación obtenidos, la metodología propuesta presenta una buena repetibilidad, proveyendo resultados exactos y precisos.

Los resultados arrojados por esta metodología no presentan diferencia estadísticamente significativa con los obtenidos por la aplicación de metodologías CLAE. El método UV-PLS se contrastó con la técnica analítica basada en Derivada de la Razón Espectral (DRE), demostrando ser más robusto que ésta. Además, DRE mostró resultados discordantes con CLAE y UV-PLS para ambos analitos.

- Se desarrollaron dos métodos analíticos útiles para la determinación simultánea de Hidroclorotiazida (HCT) y Clorhidrato de Propranolol (PRO), en las dos variantes de esta asociación farmacológica presentes en el mercado local, que difieren en la proporción de sus principios activos.

Los mismos se validaron para garantizar la calidad de sus predicciones y luego se aplicaron en ensayos de control de dosis y de disolución, así como también para la construcción de

perfiles de disolución de los comprimidos comerciales. Los métodos propuestos demostraron ser exactos, precisos y reproducibles, siendo más rápidos y amigables para el medio ambiente que las separaciones cromatográficas o extracciones con solventes que se requieren en los métodos oficiales.

La aplicación tanto de DRE como de UV-PLS dio lugar a resultados estadísticamente comparables con los procedimientos oficiales, siendo DRE el más favorecido en este caso, por ser matemáticamente más sencillo y requerir menor cantidad de soluciones de calibración.

- Se desarrolló y validó un método analítico conveniente para la determinación simultánea de Hidroclorotiazida (HCT) y Losartán Potásico (LST) en muestras sintéticas binarias y en comprimidos comerciales conteniendo ambos analitos. Este método está basado en la aplicación de metodología UV-PLS.

La técnica propuesta y validada resultó ser simple, y se caracterizó por requerir instrumentación sencilla y presentar un número de pasos menor que los métodos existentes, por lo que permite un flujo de muestras considerable. Además, la metodología desarrollada presentó una buena repetibilidad, proveyendo resultados con exactitud y precisión satisfactorias, en relación a los habituales requerimientos oficiales. Los resultados obtenidos en diversos ensayos no presentaron diferencias estadísticamente significativas con los registrados mediante el empleo de CLAE.

En suma, los diferentes métodos UV-PLS desarrollados y validados demostraron poseer características funcionales compatibles con los requerimientos oficiales modernos. Aplicados a la resolución de los problemas analíticos propuestos, dichos métodos evidenciaron capacidad predictiva comparable a la de métodos oficiales y no oficiales habitualmente preferidos para llevar a cabo esta clase de determinaciones.

La economía de solventes, la velocidad de procesamiento de los datos y la capacidad de

evaluar un elevado número de muestras que caracterizan a los métodos propuestos, los convierten en potenciales alternativas de elección frente a los métodos CLAE.

Por otro lado, se desarrollaron además aplicaciones de índole cualitativa, en las que se utilizaron Mapas Auto-organizables de Kohonen (SOM) y técnicas de Análisis de Componentes Principales (PCA). En este sentido, las aplicaciones estudiadas y las conclusiones a las que se arribó son las siguientes:

- Se emplearon gráficos de tantos ponderados de los componentes principales relevantes de las curvas de disolución con regiones de confianza (PCA-CR) como una estrategia nueva, útil para la comparación de los perfiles de disolución *in vitro* de formas farmacéuticas sólidas.

La misma constituye una alternativa ventajosa al uso de los indicadores f_1 y f_2 para efectuar la determinación de similitud entre lotes. Se estudiaron datos propios y series de datos de la literatura, de amplio uso en aspectos relacionados a esta problemática.

- Cuando se empleó un nivel de confianza del 95% para construir las regiones de confianza y se estableció la regla que al menos 80% de los comprimidos de prueba debían presentar un perfil de disolución que los calificara como similares a los comprimidos de referencia, los resultados observados con este enfoque multivariado demostraron una buena correlación con los valores de f_1 y f_2 .
- Las divergencias observadas entre PCA-CR y los resultados provistos por el uso de los indicadores f_1 y f_2 se debieron principalmente a que, a diferencia del indicador f_2 , el método propuesto tiene en cuenta la variabilidad de los datos dentro del lote de referencia para construir las regiones de confianza, por lo que resultó ser más discriminante. El método propuesto también es sensible a la variabilidad de los datos dentro del lote de prueba, así como a la forma y el tamaño de las curvas de disolución.

El empleo de técnicas de *bootstrapping* para la representación de las fronteras $f_2= 50$ en el

espacio de las PCs, demostró claramente la relación entre el funcionamiento de ambas metodologías, la oficial basada en el indicador f_2 y la propuesta, PCA-CR.

- En comparación con metodologías anteriormente publicadas basadas en PCA, la operación SVD realizada sobre una única matriz, la cual contiene los datos del conjunto de prueba y los datos del producto de referencia, resultó ventajosa ya que permitió de manera sencilla y eficaz la optimización de parámetros de sistema, proveyendo una proyección adecuada de los valores de las PCs del conjunto de prueba en el espacio de los datos de referencia.
- En el estudio de clasificación de polimorfos, PCA-CR demostró ser eficaz para caracterizar los polimorfos de Furosemida a partir de sus perfiles de disolución, con un límite de confianza estadístico; esta estrategia constituiría uno de los pocos métodos sencillos y de fácil aplicación, disponibles para caracterizar polimorfos de un principio activo en productos farmacéuticos formulados.
- La aplicación de mapas auto-organizables (SOM), basados en el uso de redes neuronales artificiales, y el uso de PCA-CR demostraron dar lugar a resultados congruentes, en el estudio de clasificación de polimorfos, siendo ambos mucho más sensibles para la comparación de perfiles de disolución que los métodos basados en los indicadores f . Sin embargo, en una comparación entre métodos, SOM resultaría desfavorecido al no poder acoplarse un límite estadístico a sus predicciones.

Por último, también se estudió el desarrollo de metodologías multivariadas para efectuar el control de calidad del aceite de oliva virgen, un aceite comestible con excelentes propiedades alimenticias, que a su vez es ampliamente utilizado como excipiente en la industria farmacéutica, arribándose a las siguientes conclusiones:

- Se desarrolló una estrategia espectroscópica con asistencia quimiométrica (FTIR-PLS) para la evaluación de los parámetros de calidad del aceite de oliva virgen. Se realizó la calibración multivariada de los valores de los parámetros, provistos por metodologías de

referencia que incluyeron determinaciones volumétricas y mediante cGC-FID, correlacionándolos con un único espectro IR por muestra de aceite. Los espectros en el IR fueron obtenidos empleando la técnica de reflectancia total atenuada (ATR).

- En la determinación del perfil de TFA, se obtuvieron muy buenos resultados para PUFA, MUFA y SFA, mediante el empleo de espectros normales pulidos. La metodología ATR-FTIR-PLS también proporcionó resultados satisfactorios para la determinación del tenor de ácido linoleico, proporcionando además resultados excelentes en el caso de la cuantificación de ácido oleico.

Por otra parte, se demostró que la mejor capacidad predictiva para PV fue alcanzada cuando la construcción del modelo de calibración PLS se realizó empleando la primera derivada de los datos espectrales, centrada en la media. Los modelos de calibración se caracterizaron por presentar cifras de mérito satisfactorias. En las diversas metodologías propuestas, no se observaron errores sistemáticos y/o de tendencia en la predicción de las muestras de validación.

- Se realizaron ensayos preliminares tendientes a lograr el desarrollo de una estrategia electroquímica con asistencia quimiométrica de tipo DPV-PLS para la cuantificación simultánea de compuestos antioxidantes, incluyendo α -tocoferol, tirosol, hidroxitirosol y catecoles derivados, en aceite de oliva virgen.

Se hizo uso de estrategias de selección del intervalo de potencial de los voltamogramas para la calibración de los diversos compuestos, lo que se realizó por medio del procedimiento de ventana móvil de ancho variable con criterio de minimización del PRESS.

- Los métodos desarrollados resultaron ser exactos, precisos y reproducibles, al ser aplicados en mezclas sintéticas, siendo más rápidos y ambientalmente más amigables que las separaciones cromatográficas o extracciones con solventes que se requieren en los métodos

tradicionales. La metodología electroquímica demostró tener gran potencialidad para su futura aplicación a la determinación de compuestos antioxidantes presentes en muestras reales de sustancias grasas.

CAPÍTULO V

RESUMEN

CAPÍTULO V:

RESUMEN

La fuerte competitividad industrial que se vive actualmente ha revolucionado el concepto de producción, aumentando paralelamente la importancia que la calidad ya había tenido tradicionalmente y modificando su sentido. Actualmente, es común que la calidad de cualquier producto industrial se utilice como su sello de garantía. La calidad es un parámetro importante para todos los sectores industriales, pero adquiere aún mayor relevancia en la industria farmacéutica.

La Gestión de la Calidad, entendida como el conjunto de actividades dirigidas a establecer objetivos y responsabilidades, y asegurar que éstos se cumplan mediante un plan estratégico, se ha convertido en una parte muy importante de la gestión general de cualquier organización. El proceso de Gestión de Calidad ayuda a poner en práctica medidas de Garantía de Calidad, entre las cuales las Buenas Prácticas de Fabricación y Control (BPFyC) se cuentan como un elemento fundamental. Las BPFyC prescriben la necesidad de efectuar Control de Calidad, convirtiendo a esta actividad en una herramienta útil e idónea para la toma de decisiones en relación a la calidad de los productos.

El Control de Calidad, se define como la parte de las Buenas Prácticas de Fabricación y Control, referidas a muestreo, ensayos, especificaciones, organización, documentación y autorización, que actúa sobre la circulación y venta de productos.

Por otro lado la Quimiometría es una sub-disciplina de la Química que utiliza de forma lógica las matemáticas, la estadística y otros métodos para diseñar o seleccionar procedimientos óptimos de medida y experimentación y para extraer la información más relevante de los datos experimentales. Esta problemática ha propiciado el desarrollo de

diferentes métodos analíticos denominados quimiométricos. La aplicación de métodos quimiométricos a problemas farmacéuticos es actualmente un área de fértil desarrollo y actividad.

El objetivo de este trabajo de Tesis ha sido el desarrollo de metodología quimiométrica como elemento clave en el desarrollo de estrategias analíticas rápidas, económicas y de gran flujo de muestras, aptas para el control de calidad de medicamentos.

Para llevar a cabo estos objetivos, se han desarrollado, validado y aplicado nuevos métodos para el control de calidad de diversos productos de interés farmacéutico, obteniéndose como resultados más salientes los que se detallan a continuación.

V.1. MÉTODOS CUANTITATIVOS PARA MEZCLAS BINARIAS

Se desarrollaron y validaron sendos métodos analíticos cuantitativos para la determinación simultánea de los analitos de interés en asociaciones farmacológicas. Las combinaciones farmacéuticas estudiadas fueron Acetaminofeno y Diclofenaco, Clorhidrato de Pseudoefedrina y Clorhidrato de Fexofenadina, Hidroclorotiazida y Losartán Potásico como así también la asociación de Hidroclorotiazida y Clorhidrato de Propranolol.

En los cuatro casos analizados, se aplicó el algoritmo de Cuadrados Mínimos Parciales (PLS) a datos espectroscópicos de las mezclas, en el UV, con selección del intervalo de sensores mediante la estrategia de la ventana móvil de ancho variable acoplada al criterio de minimización de PRESS y selección del número óptimo de factores mediante la aplicación del criterio estadístico de Haaland y Thomas ($\alpha = 0,75$).

En todos los casos, la utilidad de los métodos, previamente validados, se demostró mediante la determinación de parámetros de calidad de comprimidos comerciales conteniendo las diversas combinaciones farmacéuticas estudiadas. Los detalles más característicos de los métodos desarrollados se describen a continuación.

V.1.1. Acetaminofeno y Diclofenaco

La calibración fue llevada a cabo con un conjunto de mezclas sintéticas preparadas conformando un diseño factorial completo (4^2), comprendiendo concentraciones entre 19,97 – 29,95 mg L⁻¹ para ACE y 2,94 – 4,42 mg L⁻¹ para DIC. El intervalo óptimo de longitudes de onda para la calibración resultó ser 259 – 300 nm y 264 – 296 nm para ACE y DIC, respectivamente.

En la etapa de validación externa, PLS proporcionó resultados exactos y precisos, con recuperaciones del 100,2% para ACE y del 98,3% para DIC ($N=6$) y desviaciones estándar relativas de 0,3 y de 0,8%, respectivamente.

Cuando UV-PLS fue aplicado a la determinación simultánea de ambos analitos en comprimidos comerciales de tres marcas distintas, proporcionó resultados que estuvieron en acuerdo estadístico con los provistos por CLAE. Los perfiles de disolución de ambos analitos fueron construidos a partir de resultados de recuperaciones obtenidos por el método UV-PLS y los mismos pudieron ser ajustados a una curva sigmoidea de tipo Weibull.

El método desarrollado requirió un mínimo pre-tratamiento de las muestras y utiliza solventes y equipamiento más accesible y menos costoso que los métodos convencionales como CLAE, sumándole a ello ventajas inherentes a su mayor agilidad y velocidad.

V.1.2. Clorhidrato de Pseudoefedrina y Clorhidrato de Fexofenadina

La calibración se realizó con un conjunto de 16 muestras sintéticas, preparado siguiendo un diseño factorial completo. Los modelos obtenidos fueron validados internamente siguiendo el procedimiento “dejar uno afuera” y evaluando las cifras de mérito. La validación externa de los modelos se realizó con la ayuda de tres juegos de 9 muestras sintéticas, de concentraciones apropiadas. Los mismos resultaron ser lineales para las concentraciones comprendidas entre 160,6 y 301,2 mg L⁻¹ para FEX y entre 325,6 y 610,5 mg L⁻¹ para PSE. El método demostró

ser exacto, presentando recuperaciones de 99,8% y 99,9% ($N= 9$) para FEX y PSE, respectivamente. La precisión intermedia fue evaluada mediante la desviaciones relativas estándar que resultaron ser de 1,4% para FEX y de 1,2% para PSE ($N= 27$).

El método validado fue empleado para determinar el contenido de ambos analitos en comprimidos comerciales y los resultados fueron comparados con los proporcionados por CLAE, sin diferenciarse estadísticamente de éstos.

El método UV-PLS propuesto representa una importante mejora sobre la técnica de la Derivada de la Razón Espectral (DRE), presentando mejor exactitud y robustez.

UV-PLS presentó un alto desempeño, mínimo consumo de tiempo por muestra, reducido uso de reactivos y la generación despreciable de residuos. Los resultados obtenidos confirmaron que el método es sumamente conveniente para cumplir con su objetivo propuesto y podría ser utilizado para realizar las determinaciones en trabajos de rutina.

V.1.3. Hidroclorotiazida y Losartán Potásico

El intervalo de longitudes de onda para la calibración de ambos analitos resultó ser 220 – 274 nm. La calibración fue llevada a cabo con dos conjuntos de mezclas sintéticas independientes diseñados teniendo en cuenta dos objetivos distintos, llevar a cabo el control de dosis y construir el perfil de disolución de los comprimidos comerciales. El primero se realizó siguiendo un diseño factorial completo (4^2) en el intervalo de concentraciones 3,17 – 5,70 mg L⁻¹ para HCT y 10,08 – 20,18 mg L⁻¹ para LST. El segundo conjunto se ubicó en el intervalo de concentraciones 1,06 – 5,70 mg L⁻¹ para HCT y 3,95 – 20,18 mg L⁻¹ para LST.

El método demostró ser lineal en el respectivo intervalo de concentraciones de calibración de cada calibrador. En la etapa de validación externa PLS otorgó resultados exactos y precisos, con recuperaciones del 99,3% para HCT y el 100,4% para LST ($N= 9$). Las desviaciones estándar relativas obtenidas para las recuperaciones entre días fueron de 1,1

y 0,1% para HCT y LST, respectivamente. Además, se demostró la robustez del método en cuanto a variaciones en las longitudes de onda del intervalo de concentraciones de la calibración.

Cuando el método UV-PLS fue aplicado a la determinación simultánea de ambos analitos en comprimidos comerciales, el mismo proporcionó resultados concordantes con los provistos por CLAE. UV-PLS también fue satisfactoriamente utilizado para la construcción de los perfiles de disolución de los APIs en comprimidos comerciales.

El método es fácil de aplicar, usa un equipo relativamente simple, requiere mínimo pretratamiento de la muestra, permite un alto recambio de muestras, y genera menos solvente residual que otros procedimientos.

V.1.4. Hidroclorotiazida y Clorhidrato de Propranolol

Tres métodos basados en la utilización de PLS, la Derivada de la Razón Espectral (DRE) y Regresión sobre Componentes Principales (PCR), fueron desarrollados en esta Tesis como alternativas analíticas convenientes y útiles para la determinación simultánea de estos principios activos en formulaciones farmacéuticas. Los mismos están basados en el análisis de los espectros de absorción de las muestras en el ultravioleta, en la región 250 – 350 nm.

El intervalo de calibración se encontró entre 8,7 y 16,0 mg L⁻¹ para HCT y entre 14,0 y 51,5 mg L⁻¹ para PRO para ambos métodos. Un diseño factorial asimétrico (6 × 4) fue utilizado para realizar el conjunto de mezclas de calibración para PLS y PCR, los cuales arrojaron resultados coincidentes en los aspectos funcionales y predictivos. El intervalo óptimo de longitudes de onda fue 277 – 294 nm para HCT y 297 – 319 nm para PRO.

Las características de funcionamiento de los métodos analíticos fueron evaluadas por el empleo de muestras de validación y ambos métodos mostraron ser precisos y exactos, proporcionando recuperaciones casi cuantitativas del analito (100,1 y el 99,3% para HCT y

PRO) y desviaciones estándar relativas inferiores al 2%. Para UV-PLS los límites inferiores de cuantificación fueron 0,37 y 0,66 mg L⁻¹ para HCT y PRO, respectivamente.

Las intensidades de señal a 276 y 322 nm fueron usadas en el método de DRE para la cuantificación de HCT y PRO, respectivamente, empleando 5 soluciones de calibración para cada analito en el mismo intervalo de trabajo que PLS y PCR. En esas condiciones los LOQs fueron 1,15 mg L⁻¹ y 3,05 mg L⁻¹ para HCT y PRO, respectivamente.

Los métodos fueron usados para la cuantificación de HCT y PRO en mezclas sintéticas y en dos lotes de comprimidos comerciales que contienen proporciones diferentes de los analitos. Los resultados de los ensayos de valoración y disolución de los comprimidos estuvieron en acuerdo estadístico ($p < 0,05$) con aquellos proporcionados por los procedimientos oficiales de la USP 30. La preparación de los perfiles de disolución de los comprimidos también fue realizada con la ayuda de los métodos propuestos. Dichos métodos son fáciles para aplicar, usan equipo relativamente simple, requieren mínimo pretratamiento de la muestra y generan menos solvente residual que otros procedimientos.

V.2. PERFILES DE DISOLUCIÓN Y CALIDAD

V.2.1. Comparación de Perfiles de Disolución

Se desarrolló un nuevo método quimiométrico para ensayar la “similitud” entre lotes de comprimidos mediante la comparación de perfiles de disolución del principio activo contenido en los mismos. El método estuvo basado en el Análisis de Componentes Principales acoplado a Regiones de Confianza (PCA-CR).

Curvas de disolución correspondientes a tres marcas de comprimidos comerciales de Furosemida y otras tantas de Acetaminofeno, tomadas como principios activos modelo, fueron preparadas por medidas de la cantidad de analito disuelto a múltiples puntos temporales pre-especificados. Datos de referencia y de prueba fueron simultáneamente

sometidos a PCA y comparaciones entre lotes de la misma marca y entre lotes de marcas diferentes fueron realizadas. Las comparaciones fueron llevadas a cabo utilizando gráficos bidimensionales de los tantos ponderados de los dos primeros PCs de las curvas de disolución de los lotes de referencia y de prueba, mientras que la decisión de comparación de perfiles de disolución acerca de la “similitud” fue realizada comprobando la inclusión de más del 80% de los comprimidos del lote de prueba ($\geq 10/12$) en la elipse de confianza del 95% de los comprimidos de referencia. Dos conjuntos de datos de la literatura también fueron analizados siguiendo el mismo procedimiento.

Los resultados obtenidos en todos los casos fueron contrastados con los resultados provistos por la metodología basada en los estimadores f_1 y f_2 , de uso oficial. A diferencia de la metodología oficial, el método PCA-CR demostró poseer gran sensibilidad en cuanto a cambios de nivel y forma de las curvas de disolución. La comparación entre el área incluida por las elipses de confianza de los tantos ponderados y la región obtenida de los valores del *bootstrap* del parámetro f_2 sugirió que PCA-CR representa un estándar más exigente y discriminante.

Por ello, PCA-CR demostró ser un instrumento sumamente útil, de fácil implementación y rápida toma de decisión para proporcionar, desde el punto de vista farmacéutico, la evaluación de similitud entre lotes diferentes de un mismo producto, o productos de marcas diferentes que contienen el mismo ingrediente activo.

V.2.2. Calificación de Polimorfos de Furosemida

Se estudió el desarrollo de un método analítico cualitativo capaz de diferenciar las distintas formas cristalinas de un principio activo mediante la aplicación de técnicas multivariadas como PCA-CR acoplada a perfiles de disolución, empleando Furosemida como modelo. Se prepararon cápsulas conteniendo diferentes polimorfos de furosemida y se

estudiaron diferentes medios para la disolución, seleccionando como más discriminante la solución de HCl/KCl, pH= 2,2. Perfiles de disolución de 12 cápsulas por lote conteniendo los polimorfos fueron construidos, determinando la cantidad del principio activo disuelto a tiempos predeterminados.

Se adoptó como criterio para la toma de decisión que para ser similares el 80% de las unidades del lote de prueba debe permanecer dentro de la región de confianza del 99% del lote del polimorfo de referencia. PCA-CR fue capaz de diferenciar correctamente los perfiles de disolución de los lotes de referencia, conteniendo los polimorfos P-I, P-II y P-III. Cuando se comparó los mismos con el perfil de disolución de un lote de cápsulas preparadas a partir de polvo de un producto comercial, se observó que el mismo mantuvo un comportamiento muy cercano al de P-I, pudiendo ser considerado similar al mismo mediante PCA-CR, según los criterios pre-establecidos.

Por otra parte, se aplicó la técnica SOM a la clasificación de perfiles de disolución de polimorfos, por medio de la cual se lograron observar las similitudes y diferencias en el comportamiento de los tres polimorfos.

V.3. ESTUDIOS QUIMIOMÉTRICOS SOBRE ACEITE DE OLIVA VIRGEN

V.3.1. Perfil de Ácidos Grasos e Índice de Peróxidos

Se desarrolló una serie de métodos quimiométricos rápidos a partir de datos espectroscópicos en el infrarrojo medio ($4000 - 700 \text{ cm}^{-1}$), útil para determinar simultáneamente y mediante el uso de un solo espectro por muestra diferentes parámetros de calidad del aceite de oliva virgen, que incluyeron el índice de peróxidos (PV) y el perfil de los ácidos grasos. Los modelos de calibración fueron construidos usando el método PLS a partir de datos espectroscópicos obtenidos con un espectrofotómetro con transformada de Fourier equipado con un dispositivo de reflectancia total atenuada, lo cual permitió adquirir los

espectros de una manera ágil y con mínimo uso de solventes.

Para la determinación de PV, se calibró usando el intervalo espectral completo, empleando la derivada segunda de la señal de la muestra como pre-tratamiento. Se utilizaron 25 muestras de calibración, que contuvieron 5,7 a 15,7 meqO₂ Kg⁻¹, según determinaciones efectuadas por el método oficial.

La composición de TFA de las 63 muestras del aceite fue determinada según el método oficial, mediante análisis cGC-FID y los datos fueron utilizados para la calibración contra el espectro FTIR de dichas muestras (700 – 3100 cm⁻¹). Para el análisis de TFA fueron considerados los tenores de ácido oleico (63 – 80%), ácido linoleico (5 – 15%), ácidos grasos saturados (SFA, 13 – 18%), ácidos grasos mono-insaturados (MUFA, el 64 – 81%) y ácidos grasos poli-insaturados (PUFA, 6 – 16%).

Los valores de LOD de los métodos quimiométricos fueron de 1,6 meqO₂ Kg⁻¹ para PV, 3,1% para el ácido oleico, 0,5% para el ácido linoleico, 1,4% para SFA, 3,2% para MUFA y 0,3% para PUFA. Las características de funcionamiento de los métodos analíticos fueron evaluadas por el empleo de muestras de validación (*N*= 25 para TFA y 10 para PV) con tasas de recuperación casi cuantitativas (98 – 103%) para todos los parámetros estudiados.

V.3.2. Compuestos Antioxidantes

Se realizaron estudios preliminares para el desarrollo de un método PLS acoplado a potenciometría diferencial de pulso (DPV) con el fin de cuantificar el contenido de tirosol (TSL), hidroxitirosol (HTSL) y α -tocoferol (TOC) en aceite de oliva virgen. Para implementar la técnica DPV, se empleó un electrodo de referencia de Ag/AgCl–3M KCl, un electrodo de hilo de platino como control y un electrodo de trabajo de carbono vítreo de 3 mm de diámetro. Las determinaciones se realizaron en un medio no acuoso, conteniendo H₂SO₄ 0,2 M y acetato de tetrabutilamonio 0,06 M en una mezcla hexano-etanol (40:60). Las señales se

adquirieron cada 0,005 V con un potencial de pulso de 0,06 V, a una velocidad de barrido de 0,005 V/s, en el intervalo 0,000 – 0,800 V.

Un conjunto de 20 mezclas de calibración de los analitos, cuyas concentraciones fueron seleccionadas siguiendo un diseño central compuesto a tres factores, en los intervalos 7,40 – 14,6 ppm para TOC, 0,78 – 1,57 ppm para TSL y 0,32 – 0,88 ppm para HTSL. La matriz oleosa se simuló mediante adición de una cantidad fija de aceite de oliva previamente refinado.

Para la calibración, la selección del intervalo de potencial de los voltamogramas de los diversos compuestos se realizó por medio de la estrategia de ventana móvil de ancho variable con criterio de minimización del PRESS. El mínimo PRESS fue alcanzado con un número de 5 LVs en el intervalo de 0,220 – 0,725 V para TOC. Para cuantificar TSL la segunda derivada fue el pre-tratamiento que proporcionó mejores resultados, mientras que para cuantificar HTSL, se efectuó la primera derivada de los datos, por proveer el mejor desempeño predictivo. La ventana de derivación en ambos casos fue de 0,105 V, equivalente a 21 puntos o escalones del voltamograma.

La exactitud y la precisión del método propuesto fueron evaluadas utilizando un conjunto de 6 mezclas sintéticas distintas a las del conjunto de calibración. El porcentaje de recuperación de cada analito para cada grupo fue calculado, siendo en todos los casos no significativamente diferente al 100%, por lo que se puede afirmar que el método es exacto. Por su parte, las desviaciones estándar de la predicción oscilaron entre 6 y 9%, demostrando la adecuada precisión del método.

Finalmente se puede concluir que los métodos desarrollados se aplicaron a la valoración de materias primas o productos formulados (control de dosis de comprimidos comerciales, cuantificación de parámetros o componentes en el aceite de oliva), a la evaluación del ensayo de disolución, a la elaboración de perfiles de disolución de comprimidos, a la calificación de

perfiles de disolución de comprimidos y a la caracterización de polimorfos a partir del análisis de sus perfiles de disolución. Los resultados obtenidos fueron comparados con los provistos por metodologías de referencia o procedimientos analíticos alternativos, que incluyeron volumetría, espectrofotometría GC y CLAE, dando lugar a valores concordantes en todos los casos.

Todos los métodos desarrollados presentan mayor simplicidad en la preparación de muestra que los convencionales, son rápidos, económicos, de gran flujo de muestras, exhiben exactitud y precisión apropiadas y pueden constituirse en una alternativa válida y eficiente para el control de calidad rutinario de los analitos de interés en las matrices estudiadas.

ABSTRACT

The strong industrial competitiveness that characterizes modern times has radically changed the concept of production, simultaneously increasing the traditional relevance of quality and modifying its sense. Nowadays, it is not uncommon to observe the quality of any industrial product being advertised as part of its marketing effort. Quality is an important parameter for all industrial sectors; however, it acquires still greater relevance in the pharmaceutical industry.

The Management of the Quality, understood as the set of activities directed to establishing goals and responsibilities, and to assure that these would be fulfilled by means of a strategic plan, has turned into a key and highly important part of the general management of any organization. The process of Quality Management helps to put into practice directives of Quality Assurance, among which the Good Manufacturing Practices (BPFyC – GMP) are a fundamental element. The GMPs prescribe the need to carry out Quality Control, turning to the latter activity into a useful and suitable tool for the decision taking process, in relation to the quality of the products.

Quality Control is defined as the part of the Good Manufacturing Practices, which deals with sampling, testing, specifications, organization, documentation, and authorization, acting on the traffic and sales of products.

On the other hand Chemometrics is a sub-discipline of Chemistry that combines the sound use of mathematics, statistics and other methods with the aim to design or to select ideal measurement and experimental procedures and to extract the most relevant experimental information.

This area has propitiated the development of different analytical methodologies, termed chemometric methods. Their application to pharmaceutical problems is nowadays an area of

fertile development and febrile activity.

The aim of this Thesis has been the inclusion of chemometrics methodology as the key element in the development of rapid and economic analytical strategies, suitable for the routinary quality control of medicines and characterized by their simplicity and high sample throughput.

In order to fulfil the objectives, new methods have been developed, validated and applied to the quality control of various products of pharmaceutical interest, as detailed below.

V.1. QUANTITATIVE METHODS FOR BINARY MIXTURES

Quantitative analytical methods have been developed and validated for the simultaneous determination of the analytes of interest in pharmacological associations. The studied pharmaceutical combinations were Acetaminophen and Diclofenac, Pseudoephedrine Hydrochloride and Fexofenadine Hydrochloride, Hydrochlorothiazide and Losartan Potassium, as well as the the association between Hydrochlorothiazide and Propranolol Hydrochloride.

In the four cases, the Partial Least Squares (PLS) algorithm was applied to spectroscopic information of the mixtures, acquired in the UV spectral region; selection of the interval of sensors was carried out by means of the strategy of the mobile window of changeable width, associated to the criterion of PRESS minimization, while selection of the ideal number of latent factors was carried out by application of the statistical criterion of Haaland and Thomas ($\alpha = 0.75$).

In the studied cases, the usefulness of the validated methods was demonstrated by means of the determination of quality parameters of commercial tablets containing the pharmaceutical combinations of interest. Specific and relevant details of each method are given below.

V.1.1. Acetaminophen and Diclofenac

The calibration was carried out employing a set of synthetic mixtures prepared according to a full factorial design (4^2), and including analyte concentrations between 19.97 – 29.95 mg L⁻¹ for Acetaminophen (ACE) and 2.94 – 4.42 mg L⁻¹ for Diclofenac (DIC). The most appropriate wavelengths interval for the calibration turned out to be 259 – 300 nm and 264 – 296 nm for ACE and DIC, respectively.

In the external validation stage, PLS provided accurate and precise results, with recoveries of 100.2% for ACE and 98.3% for DIC ($N= 6$), and relative standard deviations of 0.3 and 0.8%, respectively.

When the UV-PLS method was applied to the simultaneous determination of both analytes in three different brands of their combined commercial tablets, it furnished results that were in statistical agreement with those provided by HPLC methods. The dissolution profiles of both analytes were also constructed with the aid of the UV-PLS method, and adjusted to Weibull type sigmoidal curves.

The developed method requires minimum sample pre-treatment and employs more accessible and less costly solvents and equipment than the conventional HPLC methodologies, with added advantages inherent to its greater sample throughput.

V.1.2. Pseudoephedrine Hydrochloride and Fexofenadine Hydrochloride

The calibration models were constructed with a set of 16 synthetic samples following a full factorial design. The so obtained models were internally validated by the use of the “leave one out” procedure, with additional evaluation of the figures of merit. The external validation of the models was carried out with the help of three sets of nine synthetic samples, of appropriate concentrations. The method demonstrated to be linear in the concentration ranges between 160.6 and 301.2 mg L⁻¹ for Fexofenadine Hydrochloride (FEX) and between 325.6

and 610.5 mg L^{-1} for Pseudoephedrine Hydrochloride (PSE). The method also demonstrated to be accurate, presenting analyte recoveries of 99.8% and 99.9% for FEX and PSE, respectively ($N= 9$). The intermediate precision was evaluated by means of the relative standard deviations of recovery experiments carried out in three different days, that turned out to be of 1.4% for FEX and 1.2% for PSE ($N= 27$).

The validated method was used to determine the content of both analytes in their commercial tablets and the results were compared with those provided by HPLC; no statistical difference was found between them.

The proposed UV-PLS method represents an important improvement over the previously reported Derivative of the Spectral Ratio (DRE) methodology, presenting better performance in terms of accuracy and robustness.

UV-PLS presented high performance, minimum time consumption for sample preparation, reduced use of reagents and the low generation of residues. The obtained results confirmed that the method is extremely suitable to comply with its proposed aim and it might be confidently used to carry out the analytes' determinations in routine work.

V.1.3. Hydrochlorothiazide and Losartan Potassium

The wavelengths interval for the calibration of both analytes was 220 – 274 nm. The calibration models were prepared employing two sets of synthetic independent mixtures designed bearing two different aims in mind, to carry out the dose control and to construct the dissolution profiles of each analyte in the corresponding commercial tablets. The first calibration set fulfilled a full factorial design (4^2) in the concentrations interval $3.17 - 5.70 \text{ mg L}^{-1}$ for Hydrochlorothiazide (HCT) and $10.08 - 20.18 \text{ mg L}^{-1}$ for Losartan Potassium (LST). The second set comprised an asymmetric design in the concentrations range of $1.06 - 5.70 \text{ mg L}^{-1}$ for HCT and $3.95 - 20.18 \text{ mg L}^{-1}$ for LST.

The method demonstrated to be linear for both analytes in the tested concentrations interval. In the external validation stage, the UV-PLS method provided accurate and precise results, with recoveries of 99.3% for HCT and 100.4% for LST ($N=9$). In the intermediate precision test, the relative standard deviations obtained for the between-days recoveries were 1.1 and 0.1% for HCT and LST, respectively. In addition, the robustness of the method was demonstrated against variations in the calibration wavelength interval.

When the UV-PLS method was applied to the simultaneous determination of both analytes in commercial tablets, it provided results which were in statistical agreement with those furnished by HPLC. UV-PLS was also satisfactorily used for the construction of the dissolution profiles of the active pharmaceutical ingredients in commercial tablets.

The method is easy to apply, uses relatively simple equipment, needs minimum sample pre-treatment, allows a high sample throughput, and generates less residual solvent than other procedures.

V.1.4. Hydrochlorothiazide and Propranolol Hydrochloride

Three methods based on the use of PLS, DRE and Principal Components Regression (PCR), were developed as analytical suitable and useful alternatives for the simultaneous determination of these active ingredients in their combined pharmaceutical formulations. The methods were based on the analysis of the absorption spectra of the samples in the ultraviolet region between 250 and 350 nm.

The calibration was constructed between 8.7 and 16.0 mg L⁻¹ for HCT and between 14.0 and 51.5 mg L⁻¹ for Propranolol Hydrochloride (PRO) for both multivariate methods. An asymmetric factorial design (6×4) was used to carry out the calibration for PLS and PCR, which demonstrated to have very similar predictive abilities and figures of merit. The ideal wavelength intervals were 277 – 294 nm for HCT and 297 – 319 nm for PRO.

The performance characteristics of the analytical methods were evaluated by the use of validation samples. Both methods showed to be precise and accurate, providing almost quantitative recoveries of the analytes (100.1 and 99.3% for HCT and PRO, respectively) and relative standard deviations lower than 2%. For UV-PLS the limits of quantitation were 0.37 and 0.66 mg L⁻¹ for HCT and PRO, respectively.

The signal intensities at 276 and 322 nm were used in the DRE method for the quantification of HCT and PRO, respectively. Sets of five solutions were employed for the calibration of each analyte; under these conditions, the LOQ values were 1.15 mg L⁻¹ and 3.05 mg L⁻¹ for HCT and PRO, respectively.

The methods were used for the quantification of HCT and PRO in synthetic mixtures and in two lots of commercial tablets containing different proportions of the analytes. The results of the assays and dissolution tests of the tablets were in statistical agreement ($p < 0.05$) with those provided by the official procedures of the USP 30. The preparation of the dissolution profiles of the tablets was also carried out with the aid of the proposed methods. The above mentioned methods are easy to apply, use relatively simple equipment, need minimum sample pre-treatment and generate less residual solvent than other procedures.

V.2. DISSOLUTION PROFILES AND QUALITY

V.2.1. Comparison of Dissolution Profiles

A new chemometric method was developed to test the “similarity” between lots of tablets by comparison of the dissolution profiles of their active principle. The method was based on the use of Principal Components Analysis coupled to Confidence regions (PCA-CR).

Dissolution curves corresponding to three brands of commercial tablets of Furosemide and others containing Acetaminophen, taken as model active principles, were prepared by

dissolution measurements at multiple pre-specified time points. Information of reference and test sets was simultaneously submitted to PCA and comparisons between lots of the same brand and between lots of different brands were carried out.

The comparisons were carried out using two-dimensional graphs considering the first two PCs of the dissolution curves of the reference and test lots. The decision regarding “similarity” was taken after verifying the inclusion of more than 80% of tablets of the test lot ($\geq 10/12$) in the 95% confidence ellipse of the reference tablets. Two data sets taken from the literature were also analyzed following the same procedure.

The results obtained in all the cases were compared with the results provided by the methodology based on the officially used f_1 and f_2 indicators. Unlike the official methodology, the method PCA-CR demonstrated to possess high sensitivity against shape and size of the dissolution curves. The comparison between the area included by the confidence ellipses and the region obtained by *bootstrapping* the f_2 parameter at the $f_2= 50$ level suggested that PCA-CR represents a more discriminating standard.

Therefore, PCA-CR demonstrated to be an extremely useful instrument, which is easy to implement and which quickly furnishes sound decisions regarding “similarity” from the pharmaceutical point of view. The evaluation of similarity can be carried out between different lots of the same product, or products belonging to different brands, that contain the same active ingredient.

V.2.2. Qualification of Polymorphs of Furosemide

The development of an analytical qualitative method capable of differentiating the different crystalline forms of an active principle by means of the application of multivariate methodologies such as PCA-CR to dissolution profiles was studied, using Furosemide as model active pharmaceutical ingredient.

Capsules were prepared containing three different polymorphs of Furosemide and different dissolution media were studied, selecting the HCl/KCl solution, pH =2.2 as the most discriminating medium. Dissolution profiles of 12 capsules per lot containing the different polymorphs were constructed by determination of the recoveries of the active principle at pre-determined time-points.

For decision taking, it was adopted the following criterion: to be polymorphically similar, at least 80% of the units of the test lot must fall inside of the 99% confidence region of the reference polymorph lot. PCA-CR was capable of correctly differentiating the dissolution profiles of the reference lots, containing the polymorphs P-I, P-II and P-III. When these were compared with the dissolution profile of a lot of capsules prepared from powder of a commercial product, it was observed that it exhibited a behavior compatible with that of P-I, being able to be considered as similar to it by means of PCA-CR, according to the pre-established criterion.

On the other hand, Self Organizing Maps (SOM) technology was applied to the classification problem of the dissolution profiles of the polymorphs. Similarities and differences in the behavior of the three polymorphs were clearly observed.

V.3. CHEMOMETRICS STUDIES ON VIRGIN OLIVE OIL

V.3.1. Fatty Acids Profile and Peroxide Value

Employing spectroscopic information in the infrared region ($700 - 4000 \text{ cm}^{-1}$), a series of chemometrics methods were developed and validated. They demonstrated to be useful for the simultaneous determination of different quality parameters of virgin olive oil, which included the index of peroxides (PV) and the fatty acids profile, employing only one spectrum per sample.

The calibration models were constructed using the PLS method on spectral information

obtained with a FTIR instrument equipped with an attenuated total reflectance device, which allowed fast and simple spectral acquisition, with minimal use of solvents.

For the determination of the Peroxide Value (PV), the system was calibrated employing the second derivative of the signal as data pre-treatment in the complete spectral interval. A set of 25 samples, which contained 5.7 to 15.7 meqO₂ Kg⁻¹, according to determinations effected by the official method, was used for calibration.

The Total Fatty Acid (TFA) composition of 63 samples of the oil was determined according to the official method, by means of cGC-FID analysis and the information was used for the calibration against the FTIR spectra of the samples (3100 – 700 cm⁻¹). The TFA analysis included the levels of oleic acid (OA, 63 – 80%), linoleic acid (LA, 5 – 15%), Saturated Fatty Acids (SFA, 13 – 18%), Mono-Unsaturated Fatty Acids (MUFA, 64 – 81%) and Poly-Unsaturated Fatty Acids (PUFA, 6 – 16%).

LOD values of the chemometrics methods were 1.6 meqO₂ Kg⁻¹ for PV, 3.1% for OA, 0.5% for LA, 1.4% for SFA, 3.2% for MUFA and 0.3% for PUFA. The performance characteristics of the analytical methods were evaluated by the use of independent validation sets of samples (*N*= 25 for TFA and 10 for PV), where almost quantitative recovery rates (98 – 103%) for all the studied parameters were observed.

V.3.2. Antioxidant Compounds

Preliminary studies were performed for the development of a PLS method combined with differential pulse voltammetry (DPV) in order to quantify the content of tyrosol (TSL), hydroxytyrosol (HTSL) and α -tocopherol (TOC) in virgin olive oil. To implement the DPV methodology, a Ag/AgCl-3M KCl reference electrode was employed, in conjunction with a platinum wire electrode as control and a 3 mm diameter glassy carbon working electrode. The determinations were carried in a non-aqueous medium, containing 0.2 M H₂SO₄ and 0.06 M

tetrabutylammonium acetate in a hexane-ethanol (40:60) mixture. The signals were acquired every 0.005 V with a pulse potential of 0.06 V, at a sweep speed of 0.005 V/s, in the interval 0.000 – 0.800 V.

A set of 20 calibration mixtures containing the analytes at concentrations selected according to a three-factors central composite design, in the intervals comprising 7.40 – 14.6 ppm for TOC, 0.78 – 1.57 ppm for TSL and 0.32 – 0.88 ppm for HTSL. The olive oil matrix was simulated by addition of a fixed quantity of refined olive oil.

For the calibration, the selection of the interval of potentials of the voltammograms was carried out by means of the strategy of the mobile window of changeable width coupled to the criterion of minimization of the PRESS. The minimum PRESS was reached for 5 LVs in the interval between 0.220 and 0.725 V for TOC. Due to its improved predictive ability, in order to quantify TSL, the second derivative of the signal was employed as pre-treatment. However, in order to quantify HTSL, the first derivative of the voltammogram was used, this providing the best prediction performance. The derivation window in both cases was 0.105 V, equivalent to 21 points/steps in the voltammogram.

The accuracy and the precision of the proposed method were evaluated using a set of 6 independent synthetic mixtures, different from those of the calibration set. The percentage of recovery of every analyte for every group was calculated, being in all the cases not significantly different from 100%; therefore, it is possible to affirm that the method is accurate. On the other hand, the standard deviations of the prediction ranged between 6 and 9%, demonstrating that the precision of the method was satisfactory.

Finally it is possible to conclude that the developed methods were applied to the assay (control of dose of commercial tablets or quantification of key parameters or components in virgin olive oil), to the evaluation of the dissolution test, to the elaboration of dissolution profiles of tablets, to the qualification of dissolution profiles of tablets and to the

characterization of polymorphs from the analysis of their dissolution profiles. The obtained results were compared with those provided by reference methodologies or alternative analytical procedures, which included volumetric, spectrophotometric, GC and HPLC, yielding statistically agreeing values in all the studied cases.

All the developed methods require only minor sample preparation efforts, compared with the corresponding conventional methodologies, are rapid and economic, exhibit high sample throughput, as well as satisfactory accuracy and precision. They can become valid and efficient alternatives for the routine quality control of the studied analytes in their matrices.

CAPÍTULO VI

ANEXOS

CAPÍTULO VI:

ANEXOS

VI.1. RUTINA DE CONVERSIÓN DE DATOS ADQUIRIDOS MEDIANTE EL USO DE DIVERSOS INSTRUMENTOS EN MATRICES, APTAS PARA SU MANIPULACIÓN POR PLS O PCR

```

% Esta rutina carga todo tipo de archivos ascii compatibles en formato a dos
% columnas ([sensores,señales]) y los ordena en forma de matriz para utilizarlos
% luego en rutinas PLS o PCA.
% Los archivos deben poseer el mismo tipo de extensión y estar numerados de
% manera correlativa.
% Cambiando el tipo de extensión del archivo, en la variable homónima, se cambia
% el tipo de archivo a cargar.

% La extensión puede ser txt, dpt, pss, doc y otros archivos ASCII compatibles.

% Limpia el espacio de trabajo para comenzar sin variables
clear; clc; close all;

% Levanta todos los archivos que estén en este directorio, en forma de celda
a= dir(extension);
b= size(a,1);

% De a uno llama los archivos y los carga al espacio de trabajo
for i= 1:b;
    load(GETFIELD(a,{i,1},'name'));
end

% Limpia las variables a reutilizar
clear a b i ans

% Levanta todos los archivos presentes en el espacio de trabajo en forma
a= who;
b= size(a,1);

% Llama los archivos de a uno, extrae la información de la señal y los ubica en
% forma de matriz
for i= 1:b;
    c= eval(a{ i });
    matriz(:,i)= c(:,2);
end

% Transpone la matriz
matriz= matriz';

% Llama un vector y extrae el vector de sensores: potenciales, longitudes de
% onda o número de onda
Landa= c(:,1);

% Crea un gráfico de sensores vs. datos de intensidad de señal
plot(Landa, matriz')

% Limpia las variables obsoletas
clear a b c i

% Muestra en pantalla la información que se halla en el espacio de trabajo
Whos

```

VI.2. RUTINA DE CONVERSIÓN DE DATOS ADQUIRIDOS MEDIANTE EL USO DEL ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS SHIMADZU 1650 EN MATRICES ESPECTRALES, Y OPCIONALMENTE DE CONCENTRACIÓN, APTAS PARA SU MANIPULACIÓN POR PLS O PCR

```

Clc % Borra la pantalla
disp('      Conversión de Datos Espectrales (Shimadzu 1650) en Matrices Espectrales')
disp('      ')
disp('Se creará una matriz "c" con los datos entrados. Esta puede designarse con')
disp('un nombre a voluntad; lo mismo ocurre con cada espectro. Requiere que todos')
disp('los espectros (.txt) estén disponibles en orden cronológico. Si ello no')
disp('ocurre, deberán cambiarse apropiadamente colocando los espectros faltantes')
disp('que luego deberán ser eliminados. Para funcionar, esta rutina y la función')
disp('delsamps deben colocarse en la misma carpeta que los datos, junto con la')
disp('información de concentración')
disp('Para cargar datos de concentración se deberá construir sendos archivos en')
disp('MSWord donde las concentraciones están dispuestas como un vector columna.')
disp('Grabar cada archivo como "nombre.txt" en modo "texto" en la carpeta de los')
disp('datos a convertir.')
disp('Si están disponibles, puede operarse simultáneamente sobre los datos')
disp('espectrales y de concentración, por ejemplo eliminando datos. Esta versión')
disp('permite comenzar la conversión a partir de un espectro que no es el primero')
disp('de la serie, siempre que el total de espectros a convertir coincida con el')
disp('total de concentraciones del analito de interés');
disp('      ')
dia= input('Desea un registro de la información? (0)= NO; (1)= SI      ');
if dia== 1
    nomdia= input('Entre un Nombre para el Registro Diario      ','s');
    diary(nomdia);
    disp(' ');
disp('***Conversión de Datos Espectrales (Shimadzu) en Matrices Espectrales***');
disp(' ');
fprintf('Fecha de la Operación:      %s',date);
disp(' ');
disp('Entre una descripción (2 x 1 línea) del trabajo para registrar en diario');
disp(' ');
comentario= input('Descripción: ','s');
comentario= input('Descripción: ','s');
disp(' ');
end

cc= 0;conco= 0;concol= 0;rng= 0;spctr= 0;
compon= input('Entre el Número de Componentes de su Muestra (1-4)=      ');
% Si es un solo componente
con1= input('Nombre (min. 8 caracteres) del Componente N° 1=
    ','s');
[q,w1]= size(con1);
if w1< 8
    con1(w1+1:8)= '*';

```

```

end

% Si son 2 componentes
if compon == 2
    con2= input('Nombre (min. 8 caracteres) del Componente N° 2=
        ','s');
    [q,w2]= size(con2);
    if w2< 8
        con2(w2+1:8)= '*';
    end
end

% Si son 3 componentes
if compon == 3
    con2= input('Nombre (min. 8 caracteres) del Componente N° 2=
        ','s');
    [q,w2]= size(con2);
    if w2< 8
        con2(w2+1:8)= '*';
    end

    con3= input('Nombre (min. 8 caracteres) del Componente N° 3=
        ','s');
    [q,w3]= size(con3);
    if w3< 8
        con3(w3+1:8)= '*';
    end
end

% Si son 4 componentes
if compon == 4
    con2= input('Nombre (min. 8 caracteres) del Componente N° 2=
        ','s');
    [q,w2]= size(con2);
    if w2< 8
        con2(w2+1:8)= '*';
    end

    con3= input('Nombre (min. 8 caracteres) del Componente N° 3=
        ','s');
    [q,w3]= size(con3);
    if w3< 8
        con3(w3+1:8)= '*';
    end

    con4= input('Nombre (min. 8 caracteres) del Componente N° 4=
        ','s');
    [q,w4]= size(con4);
    if w4< 8
        con4(w4+1:8)= '*';
    end
end

ini= input('Sensor Inicial=
final= input('Sensor Final=
lini= 3;%input('Número de línea inicial para la lectura del archivo (19 o 20)= ');
cc= final-ini+1;

```

```

nume= input('Número Total de Espectros ');
nombre= input('Nombre de los Archivos Espectrales (Menos Último Dígito)= ','s');
matriz= input('Nombre para la Futura Matriz de Espectros= ','s');
especn= input('Nombre para los Espectros Individuales=
','s');
tit1= sprintf('Nombre para la Matriz de Concentraciones de %s
','con1(1:8));
Conccc1= input(tit1,'s');

if compon == 2
    tit2= sprintf('Nombre para la Matriz de Concentraciones de %s ','con2(1:8));
    Conccc2= input(tit2,'s');
end

if compon == 3
    tit2= sprintf('Nombre para la Matriz de Concentraciones de %s
','con2(1:8));
    Conccc2= input(tit2,'s');

    tit3= sprintf('Nombre para la Matriz de Concentraciones de %s
','con3(1:8));
    Conccc3= input(tit3,'s');
end

if compon == 4
    tit2= sprintf('Nombre para la Matriz de Concentraciones de %s
','con2(1:8));
    Conccc2= input(tit2,'s');

    tit3= sprintf('Nombre para la Matriz de Concentraciones de %s
','con3(1:8));
    Conccc3= input(tit3,'s');

    tit4= sprintf('Nombre para la Matriz de Concentraciones de %s
','con4(1:8));
    Conccc4= input(tit4,'s');
end

disp(' ')
concen= 0;
concen= input('Desea cargar datos de concentración? (0)= NO; (1)= SI ');
if concen== 1
    tit3= sprintf('Nombre del Archivo con Datos de %s ','con1(1:8));
    nombre1= input(tit3,'s');
    mat1= char(eval('nombre1'));
    eval(['load ',mat1,'.txt']);
    conco1= eval(nombre1);% matriz de concentraciones
    [cc1,cc2]= size(conco1);
    if nume ~= cc1
disp('ALERTA: El vector de concentraciones no representa a las muestras a entrar')
        break
    end
end

```

```

if compon == 2
    tit4= sprintf('Nombre del Archivo con Datos de %s          ',con2(1:8));
    nombre11= input(tit4,'s');
    mat11= char(eval('nombre11'));
    eval(['load ',mat11,'.txt']);
    conco2= eval(nombre11);%matriz de concentraciones
    [cc11,cc21]= size(conco2);
    if nume ~= cc11
disp('ALERTA: El vector de concentraciones no representa a las muestras a entrar')
        break
    end
end

if compon == 3
    tit4=sprintf('Nombre del Archivo con Datos de %s
    ',con2(1:8));
    nombre11= input(tit4,'s');
    mat11= char(eval('nombre11'));
    eval(['load ',mat11,'.txt']);
    conco2= eval(nombre11);%matriz de concentraciones
    [cc11,cc21]= size(conco2);
    if nume ~= cc11
disp('ALERTA: El vector de concentraciones no representa a las muestras a entrar')
        break
    end

    tit4a= sprintf('Nombre del Archivo con Datos de %s          ',con3(1:8));
    nombre11a= input(tit4a,'s');
    mat11a= char(eval('nombre11a'));
    eval(['load ',mat11a,'.txt']);
    conco3= eval(nombre11a);%matriz de concentraciones
    [cc11,cc21]= size(conco3);
    if nume ~= cc11
disp('ALERTA: El vector de concentraciones no representa a las muestras a entrar')
        break
    end
end

if compon == 4
    tit4=sprintf('Nombre del Archivo con Datos de %s          ',con2(1:8));
    nombre11= input(tit4,'s');
    mat11= char(eval('nombre11'));
    eval(['load ',mat11,'.txt']);
    conco2= eval(nombre11); % Matriz de concentraciones
    [cc11,cc21]= size(conco2);
    if nume ~= cc11
disp('ALERTA: El vector de concentraciones no representa a las muestras a entrar')
        break
    end

    tit4a= sprintf('Nombre del Archivo con Datos de %s          ',con3(1:8));

```

```

nombre11a= input(tit4a,'s');
mat11a= char(eval('nombre11a'));
eval(['load ',mat11a,'.txt']);
conco3= eval(nombre11a);% Matriz de concentraciones
[cc11,cc21]= size(conco3);
if nume ~= cc11
disp('ALERTA: El vector de concentraciones no representa a las muestras a entrar')
    break
end

tit4b= sprintf('Nombre del Archivo con Datos de %s          ',con4(1:8));
nombre11b= input(tit4b,'s');
mat11b= char(eval('nombre11b'));
eval(['load ',mat11b,'.txt']);
conco4= eval(nombre11b);% Matriz de concentraciones
[cc11,cc21]= size(conco4);
if nume ~= cc11
disp('ALERTA: El vector de concentraciones no representa a las muestras a entrar')
    break
end
end

end % Fin si entró datos de concentracion

diary off;
disp(' ');

% Fabricación del vector Landa de longitudes de onda
mat2= char(eval('nombre'));
spectr= char([mat2,num2str(1),'.txt']);
Landa= 0;
cx= dlmread(spectr,'\t',2,-1);
Landa= x(ini:final,1); % Cálculo del vector Landa
end

% Evaluación de espectros
c= zeros(cc,nume);
cx= zeros(cc,nume);
for k= 1:nume
    if k< 10
        spctr= char([mat2,num2str(k),'.txt']);
            a= dlmread(spctr,'\t',2,-1);
            cx(:,k)= a(ini:final,2);
        end
    end
end

if nume > 9
    [i,j]= size(mat2);
    mat2= mat2(1:j-1);
    for k= 10:nume
        spctr= char([mat2,num2str(k),'.txt']);

```

```

        rng= [lini,1,cc+lini,1];
a= dlmread(spctr,'\t',2,-1);
        cx(:,k)= a (ini:final,2);
    end
end
c= cx';

if concen== 1
    matq1= char(eval('Conccc1'));% Para Componente N° 1
    eval([matq1, ' = conco1']);

    if compon == 2
        matq2= char(eval('Conccc2'));% Para Componente N° 2
        eval([matq2, ' = conco2']);
    end

    if compon == 3
        matq2= char(eval('Conccc2'));% Para Componente N° 2
        eval([matq2, ' = conco2']);

        matq3= char(eval('Conccc3'));% Para Componente N° 3
        eval([matq3, ' = conco3']);
    end

    if compon == 4
        matq2= char(eval('Conccc2'));% Para Componente N° 2
        eval([matq2, ' = conco2']);

        matq3= char(eval('Conccc3'));% Para Componente N° 3
        eval([matq3, ' = conco3']);

        matq4= char(eval('Conccc4'));% Para Componente N° 4
        eval([matq4, ' = conco4']);
    end
end

mat= char(eval('matriz'));
eval([mat, ' = c']);

esp= char(eval('especn'));
for i= 1:nume
    eval([esp, num2str(i) ' = c(i,:)']);
end

disp(' ');
disp('          Resumen de la Conversión de Datos')
disp(' ')
fprintf('Landa/Sensor Inicial=                %g',ini);
disp(' ')
fprintf('Landa/Sensor Final=                    %g',final);
disp(' ')

```

```

fprintf('Nombre del Archivo (Menos último Dígito)=
    %s',nombre);
disp(' ')
fprintf('Número de Muestras=                                %g',nume);
disp(' ')
fprintf('Nombre de la Matriz de los Espectros=
    %s',matriz);
disp(' ')
fprintf('Nombre de los Espectros Individuales=
    %s',especn);
disp(' ');
tit5= sprintf('Nombre del Vector de Concentraciones de %s=      ...
    %s    ',con1(1:8),Conccc1);
fprintf(tit5);
disp(' ');
if compon == 2
tit6= sprintf('Nombre del Vector de Concentraciones de %s=      ...
    %s    ',con2(1:8),Conccc2);
    fprintf(tit6);
    disp(' ');
end

    if compon == 3
        tit6= sprintf('Nombre del Vector de Concentraciones de %s=      ...
            %s    ',con2(1:8),Conccc2);
            fprintf(tit6);
            disp(' ');
        tit6a= sprintf('Nombre del Vector de Concentraciones de %s=      ...
            %s    ',con3(1:8),Conccc3);
            fprintf(tit6a);
            disp(' ');
    end

    if compon == 4
        tit6= sprintf('Nombre del Vector de Concentraciones de %s=      ...
            %s    ',con2(1:8),Conccc2);
            fprintf(tit6);
            disp(' ');
        tit6a= sprintf('Nombre del Vector de Concentraciones de %s=      ...
            %s    ',con3(1:8),Conccc3);
            fprintf(tit6a);
            disp(' ');
        tit6b= sprintf('Nombre del Vector de Concentraciones de %s=      ...
            %s    ',con4(1:8),Conccc4);
            fprintf(tit6b);
            disp(' ');
    end

diary on;
fprintf('Vector LANDA de Longitudes de Onda. L. Onda Inicial=
    %g',Landa(ini));
disp(' ')

```

```

fprintf('Vector LANDA de Longitudes de Onda. L. Onda Final=      ...
      %g',Landa(final-ini+1));
disp(' ')
diary off;
disp(' ')

% Posibilidad de eliminar datos
elimino= 0;
%elimino= input('Desea Eliminar Alguna Muestra? (0)= NO; (1)= SI
      ');
if elimino== 1
    diary on;
    disp(' ');
    samps= input('Indique Las Muestras a Eliminar (Entre Corchetes)      ');
    disp(' ');
    diary off;
    eddatax= delsamps(c,samps);
    c= eddatax;
    if concen== 1
        eddatay= delsamps(conco,samps);
        conco= eddatay;

        eddatay1= delsamps(conco1,samps);
        conco1= eddatay1;

        matq= char(eval('Conccc'));
        eval([matq, ' = conco1']);

        if compon == 2
            matq1= char(eval('Conccc1'));
            eval([matq1, ' = conco2']);
        end
    end

    mat= char(eval('matriz'));
    eval([mat, ' = c']);

    [aa1,aa2]= size(samps);
    diary on;

    disp('          Se Eliminaron Datos. Resumen de la Conversión de Datos')
    disp(' ')
    fprintf('Landa/Sensor Inicial=          %g',ini);
    disp(' ')
    fprintf('Landa/Sensor Final=          %g',final);
    disp(' ')
    fprintf('Nombre del Archivo (Menos Último Dígito)=
%s',nombre);
    disp(' ')
    fprintf('Número de Muestras=          %g',nume-aa2);
    disp(' ')

```

```

fprintf('Nombre de la Matriz de los Espectros=
%s',matriz);
disp(' ')
fprintf('Nombre de los Espectros Individuales=
%s',especn);
disp(' ')
tit5= sprintf('Nombre del Vector de Concentraciones de %s=
...
%s ',con1(1:8),Conccc1);
fprintf(tit5);
disp(' ');
if compon == 2
    tit6= sprintf('Nombre del Vector de Concentraciones de %s=
...
%s ',con2(1:8),Conccc2);
    fprintf(tit6);
    disp(' ')
end

    if compon == 3
        tit6=sprintf('Nombre del Vector de Concentraciones de %s=
...
%s ',con2(1:8),Conccc2);
        fprintf(tit6);
        disp(' ')
        tit6a= sprintf('Nombre del Vector de Concentraciones de %s=
...
%s ',con3(1:8),Conccc3);
        fprintf(tit6a);
        disp(' ')
end

        if compon == 4
            tit6=sprintf('Nombre del Vector de Concentraciones de %s=
...
%s ',con2(1:8),Conccc2);
            fprintf(tit6);
            disp(' ')
            tit6a= sprintf('Nombre del Vector de Concentraciones de %s=
...
%s ',con3(1:8),Conccc3);
            fprintf(tit6a);
            disp(' ')
            tit6b= sprintf('Nombre del Vector de Concentraciones de %s=
...
%s ',con4(1:8),Conccc4);
            fprintf(tit6b);
            disp(' ')
end

fprintf('Vector LANDA de Longitudes de Onda. L. Onda Inicial= %g',Landa(ini));
disp(' ')
fprintf('Vector LANDA de Longitudes de Onda. L. Onda Final=
...
%g',Landa(final-ini+1));
disp(' ');
diary off;

```

```

end
disp(' ')
corre= input('Indique si la Información es Correcta. (0)= NO; (1)= SI
');
disp(' ')

if corre == 0
disp('HAGA ENTER HASTA SALIR. COMIENZE NUEVAMENTE A ENTRAR LA INFORMACION');
end

if concen== 1
eval(['clear ',mat1]);
if compon == 2
eval(['clear ',mat11]);
end
end

diary on;
disp(' ');
if compon== 1
disp(con1(1:8));
disp(conco1);
disp(' ');
end

if compon == 2
disp([' 'con1(1:8),' ',con2(1:8)]);
disp([conco1,conco2]);
disp(' ');
end

if compon == 3
disp([' 'con1(1:8),' ',con2(1:8),' ',con3(1:8)]);
disp([conco1,conco2,conco3]);
disp(' ');
end

if compon == 4
disp([' 'con1(1:8),' ',con2(1:8),' ',con3(1:8),' ',con4(1:8)]);
disp([conco1,conco2,conco3,conco4]);
disp(' ');
end

diary off;
disp(' ');
clear a b c x calib Conccc Conccc1 cc cc1 cc11 cc21 cc2 concen conco conco1
conco2 conco3 decen elimino;
clear esp especn final i ini matq1 nombre11 mat11 aa1 aa2 eddatay eddatay1
eddatay1 mat3;
clear inic j k mat mat1 mat2 matq matriz nombre nombre1 nume rng spctr...

```

```

spectr samps;
clear BC BC1 CV XC XA1 CV1 ccX ccX1 lini tit1 tit2 tit3 tit4 tit5 tit6...
corre compon;
diary on;
grb= input('Desea almacenar su información? 0= NO; 1= SI ');
disp(' ');
if grb== 1
    nombre3= input('Nombre del Archivo ','s');
    mat3=char(eval('nombre3'));
    clear grb nombre3;
    eval(['save ',mat3,'.mat'])
    fprintf('Información almacenada como:
%s.mat',mat3);
    disp(' ');
end
disp(' ');
disp('La operación culminó exitosamente');
disp(' ');

diary off

```

VI.3. RUTINA DE ELIMINACIÓN DE DATOS EN MATRICES ESPECTRALES Y VECTORES DE CONCENTRACIÓN. FUNCIÓN SATÉLITE DE LA RUTINA DE CONVERSIÓN DE DATOS ADQUIRIDOS

```

%                eddata = delsamps(data, samps)
% Función usada para eliminar muestras (columnas) de una matriz de datos.
% Formato: eddata = delsamps(data,samps);
% donde data es la matriz original y samps es el vector con los números de
% columnas a eliminar; eddata es la matriz editada.

                function eddata = delsamps(data, samps)

[m,n]= size(data); % Tamaño de la matriz original de datos
[ms,ns]= size(samps); % Vector de datos a eliminar
samps= sort(samps); % Ordena los números del vector de datos a eliminar
eddata= data(1:samps(1,1)-1,:);
for i= 1:ns-1
    first= samps(1,i)+1;
    last= samps(1,i+1)-1;
    eddata= [eddata; [data(first:last,:)]];
end
eddata= [eddata; [data(samps(1,ns)+1:m,:)]]; % Matriz editada

```

VI.4. RUTINA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS BASADA EN LA ESTADÍSTICA “t” DE STUDENT

```

% Este script sirve para comparar dos medias mediante la prueba t-student,
% teniendo los valores de esas medias, sus desvíos, el N° de datos y valor de
% significación. Basado en las ecuaciones del texto Freund, J. E. (1960) "Modern
% Elementary Statistics", 2° Ed. Prentice Hall, página 270.
clc
disp('Diferencia entre medias - Ensayo de Hipótesis mediante t-Student')
disp(' ')

M1= input('Entre la media N° 1= ');
S1= input('Entre el desvío estándar de la media N° 1= ');
N1= input('Entre el N° de muestras que originaron la media N° 1= ');
disp(' ');
M2= input('Entre la media N° 2= ');
S2= input('Entre el desvío estándar de la media N° 2= ');
N2= input('Entre el N° de muestras que originaron la media N° 2= ');

T1= (M1-M2)/(sqrt(((N1-1)*S1^2)+((N2-1)*S2^2))/(N1+N2-2))*sqrt(1/N1+1/N2);
j= 1;
while j== 1
disp(' ')
SIG= input('Nivel de significación= ');
disp(' ')
if abs(T1)> abs(tinv(SIG/2,(N1+N2-2)))
    fprintf('Las medias NO SON IGUALES con nivel de significación de %g',SIG)
    fprintf('p< %g%%',100-SIG)
elseif abs(T1)< abs(tinv(SIG/2,(N1+N2-2)))
    fprintf('Las medias SON IGUALES, con nivel de significación de %g ('',SIG);
    fprintf('p< %g%%',100-SIG)
end
disp(' ')
fprintf('Valor de t Calculado= %g',abs(T1));
disp(' ');
fprintf('Valor de t Crítico= %g',abs(tinv(SIG/2,(N1+N2-
2))));
disp(' ')
M1= input('Desea probar otro nivel de significación? 0= NO; 1= SI ');
j= M1;
end

```

VI.5. RUTINA MADRE DE PCA-CR PARA LA COMPARACIÓN DE MATRICES DE PERFILES DE DISOLUCIÓN DE DOS LOTES DE COMPRIMIDOS

```

% [media, eli ,Tantos_ref ,Tantos_test ,F2]=inicio(g1,nro_g1,g2,nro_g2,boot)

% Entradas:

```

```

% g1= Perfiles de disolución del grupo de referencia
    g1=(comprimido,tiempo)
% nro_g1= Número de perfiles de disolución del grupo de referencia
% g2= Perfiles de disolución del grupo de prueba
    g2=(comprimido,tiempo)
% nro_g2= Número de perfiles de disolución del grupo de referencia
% boot= Matriz con los datos de bootstrapping para f2= 50
% boot= (comprimido,tiempo)

% Salidas
% media= Matriz con las 2 medias de ambos grupos
% eli= Matriz con los valores X e Y para la elipse de confianza
% Tantos_ref= Crea una matriz con los 2 primeros Tantos ponderados para la
% referencia
% Tantos_test= Crea una matriz con los 2 primeros Tantos ponderados para la
% prueba
% F2= Matriz con los 2 primeros Tantos ponderados para el bootstrap

Function[media,eli,Tantos_ref,Tantos_test,F2]=aranco(g1,nro_g1,g2,nro_g2,boot)

% Junta las matrices de prueba y referencia
    datin= [g1;g2];

% Centra en la media la matriz conjunta
    Tantos0= datin-ones(size(datin,1),1)*mean(datin);

% Realiza la descomposición en valores singulares de la matriz centrada
    [U,S,V] =svd(Tantos0,0);

% Crea la matriz de tantos ponderados
    Tantos= U*S;

% Realiza la elipse de confianza para la referencia y grafica los tantos
    [Xcir,Ycir]= elipse_compara(Tantos(:,1:2),nro_g1,nro_g2,0.95);

% Centra boot en la media de la matriz conjunta
    boot0= boot-ones(size(boot,1),1)*mean(datin);

% Crea la matriz de tantos ponderados para boot
    F2= boot0*pinv(V');

% Crea una matriz con los 2 primeros Tantos ponderados para la referencia
    Tantos_ref= Tantos(1:nro_g1,1:2);

% Crea una matriz con los 2 primeros Tantos ponderados para la prueba
    Tantos_test= Tantos( 1 + nro_g1 : nro_g1 * 2 ,1:2);

% Crea una matriz con las 2 medias de ambos grupos
    media(1,:)= mean(Tantos_ref);
    media(2,:)= mean(Tantos_test);

% Crea una matriz con los 2 primeros Tantos ponderados para el bootstrap

```

```
F2= F2(:,1:2);  
% Crea una matriz con los valores X e Y para la elipse de confianza  
eli= [Xcir,Ycir];
```

VI.6. RUTINA DE CÁLCULO DE LA ELIPSE DE CONFIANZA BASADA EN LA ESTADÍSTICA CHI CUADRADO. RUTINA SATÉLITE DE PCA-CR

```

% [Xcir,Ycir]= elipse_compara(dato,n1,n2,CHIS);

% Entradas:
% dato= Tantos ponderados de los lotes de prueba y referencia
% n1= Número de perfiles de disolucion del grupo de referencia
% n2= Número de perfiles de disolucion del grupo de prueba
% CHIS= Probabilidad de la Chi^2

% Salidas:
% Xcir= X de la elipse de confianza
% Ycir= Y de la elipse de confianza

function [Xcir,Ycir]= elipse_compara(dato,n1,n2,CHIS);

% Número de componentes principales que representan la muestra
P= 2;

% Separa las matrices de prueba y referencia
dato1= dato(1:n1,:);
dato2= dato(n1+1:size(dato,1),:);

% Calcula la covariancia de la matriz de prueba
COVtotal= cov(dato1);

% Calcula los autovectores y autovalores de la covariancia
[vector,V]= eig(COVtotal);
D= vector;
aaa= eig(COVtotal)';

% Calcula la chi^2
C2= CHI2INV(CHIS,P)

% Calcula la longitud de los ejes de la elipse
aa= C2 * aaa;

aa= aa.^0.5;

a= aa(1);b= aa(2);

% Calcula la media de los datos
mmm= mean(dato1);
Xmedia= mmm(1);Ymedia=mmm(2);

% Calcula la elipse con la logitud de los ejes
[Xcirculo,Ycirculo]= elipse(a,b,0);

```

```
% Rota la elipse siguiendo la orientación de los autovectores de la covariancia
Ycircu= Ycirculo'*D(:,2)';
Xcircu= Xcirculo'*D(:,1)';

% Crea una única matriz con X e Y
Elipsoide= [Ycircu+Xcircu];

% Ubica la elipse en la media de los datos
Ycir= Elipsoide(:,2)+ Ymedia;
Xcir= Elipsoide(:,1)+ Xmedia;
```

VI.7. RUTINA DE CÁLCULO DE ELIPSES EN 2D Y 3D. RUTINA SATÉLITE DEL CÁLCULO DE LA ELIPSE DE CONFIANZA BASADA EN LA ESTADÍSTICA CHI CUADRADO

```

% Función elipse calcula los puntos a una elipse en 2D o 3D centrados en el 0
%
% [Xcirculo,Ycirculo,Zcirculo]=elipse(a,b,c);
% donde a b c son las distancias a los vértices sobre los ejes X Y Z
% respectivamente. Si c= 0 da los puntos para una elipse en 2D para X e Y

function [Xcirculo,Ycirculo,Zcirculo]= elipse(a,b,c);

% Genera los puntos para la iteración de la elipse
A= (0.01:0.01:1);
for i= 1:100;
    B(i)= A(101-i);
end
orden= [B,A,B,A,B,A,B,A,B,A,B,A];

% Elipse para 2D
if c== 0

% Crea los vectores X Y vacíos
Xcirculo= zeros(1,400); Ycirculo= zeros(1,400);

% Calcula Y en función de X cuadrante por cuadrante.
for i= 1.0:100;
    Ycirculo(i)= orden(i)*b;
    Xcirculo(i)= ((1-(Ycirculo(i)/b)^2)*a^2)^.5;
end

for i= 101:200;
    Ycirculo(i)= -orden(i)*b; Xcirculo(i)= ((1-(Ycirculo(i)/b)^2)*a^2)^.5;
end

for i= 201:300;
    Ycirculo(i)= -orden(i)*b; Xcirculo(i)= -((1-(Ycirculo(i)/b)^2)*a^2)^.5;
end

for i= 301:400;
    Ycirculo(i)= orden(i)*b; Xcirculo(i)= -((1-(Ycirculo(i)/b)^2)*a^2)^.5;
end

% Elipsoide para 3D
else

% Crea los vectores X Y Z vacíos
Zcirculo= zeros(1,1200); Xcirculo= zeros(1,1200); Ycirculo= zeros(1,1200);

for i=1.0:100;
Ycirculo(i)= orden(i)*b;
Xcirculo(i)= ((1-(Ycirculo(i)/b)^2)*a^2)^.5;
end

```

```

for i= 101:200;
    Ycirculo(i)= -orden(i)*b;
    Xcirculo(i)= ((1-(Ycirculo(i)/b)^2)*a^2)^.5;
end
for i= 201:300;
    Ycirculo(i)= -orden(i)*b;
    Xcirculo(i)= -((1-(Ycirculo(i)/b)^2)*a^2)^.5;
end
for i= 301:400 ;
    Ycirculo(i)= orden(i)*b;
    Xcirculo(i)= -((1-(Ycirculo(i)/b)^2)*a^2)^.5;
end
for i= 401:500;
    Ycirculo(i)= orden(i)*b;
    Zcirculo(i)= ((1-(Ycirculo(i)/b)^2)*c^2)^.5;
end
for i= 501:600;
    Ycirculo(i)= -orden(i)*b;
    Zcirculo(i)= ((1-(Ycirculo(i)/b)^2)*c^2)^.5;
end
for i= 601:700;
    Ycirculo(i)= -orden(i)*b;
    Zcirculo(i)= -((1-(Ycirculo(i)/b)^2)*c^2)^.5;
end
for i= 701:800;
    Ycirculo(i)= orden(i)*b;
    Zcirculo(i)= -((1-(Ycirculo(i)/b)^2)*c^2)^.5;
end
for i= 801:900;
    Zcirculo(i)= orden(i)*c;
    Xcirculo(i)= ((1-(Zcirculo(i)/c)^2)*a^2)^.5;
end
for i= 901:1000;
    Zcirculo(i)= -orden(i)*c;
    Xcirculo(i)= ((1-(Zcirculo(i)/c)^2)*a^2)^.5;
end
for i= 1001:1100;
    Zcirculo(i)= -orden(i)*c;
    Xcirculo(i)= -((1-(Zcirculo(i)/c)^2)*a^2)^.5;
end
for i= 1101:1200;
    Zcirculo(i)= orden(i)*c;
    Xcirculo(i)= -((1-(Zcirculo(i)/c)^2)*a^2)^.5;
end
end
end

```

VI.8. RUTINA DE CÁLCULO REGIONES DE *BOOTSPTRAPPING* $f_2=50$ PARA PERFILES DE DISOLUCIÓN

```

%                               [salida]= bootf2(g1)
% Entradas:
% g1= conjunto de datos de disolución del lote de referencia
% salida= matriz con lo perfiles que proveen f2=50

function [salida]= bootf2(g1)

% Variable de funcionamiento
j= 0;

% loop
for i= 1:100

% Inicialización de la variación en torno al (10+/-0.5)%
bo= 9.5+1/100*i ;

salidar(1,:)= mean(g1)+bo *.995;
salidar(2,:)= mean(g1)-bo *.995;
salidar(3,1:((size(g1,2)/2)))= mean(g1(:,1:((size(g1,2)/2))))-bo *.995;
salidar(3,(size(g1,2)/2):size(g1,2))= mean(g1(:,(size(g1,2)/2):size(g1,2)))+bo...
*.995;

salidar(4,1:((size(g1,2)/2)))= mean(g1(:,1:((size(g1,2)/2)))) +bo *.995;
salidar(4,(size(g1,2)/2):size(g1,2))= mean(g1(:,(size(g1,2)/2):size(g1,2)))-bo...
*.995;

salidar(5,1:((size(g1,2)/2)))= mean(g1(:,1:((size(g1,2)/2))));
salidar(5,(size(g1,2)/2):size(g1,2))= mean(g1(:,(size(g1,2)/2):size(g1,2)))+...
1.368 * bo;

salidar(6,1:((size(g1,2)/2)))= mean(g1(:,1:((size(g1,2)/2))))-1.45 * bo;
salidar(6,(size(g1,2)/2):size(g1,2))= mean(g1(:,(size(g1,2)/2):size(g1,2)));

salidar(7,(size(g1,2)/2):size(g1,2))= mean(g1(:,(size(g1,2)/2):size(g1,2)))-...
1.368 * bo;
salidar(7,1:((size(g1,2)/2)))= mean(g1(:,1:((size(g1,2)/2))));

salidar(8,1:((size(g1,2)/2)))= mean(g1(:,1:((size(g1,2)/2)))) +1.45 * bo;
salidar(8,(size(g1,2)/2):size(g1,2))= mean(g1(:,(size(g1,2)/2):size(g1,2)));
salidar(9,1:[size(g1,2)-(size(g1,2)/4)])=...
mean(g1(:,1:[size(g1,2)-(size(g1,2)/4)])) - bo *1.166;
salidar(9,[size(g1,2)-(size(g1,2)/4)]:size(g1,2))=...
mean(g1(:,[size(g1,2)-(size(g1,2)/4)]:size(g1,2)))+ bo *0.32 ;

salidar(10,1:[size(g1,2)-(size(g1,2)/4)])=...
mean(g1(:,1:[size(g1,2)-(size(g1,2)/4)])) + bo *1.166;
salidar(10,[size(g1,2)-(size(g1,2)/4)]:size(g1,2))=...

```

```

mean(g1(:, [size(g1,2) - (size(g1,2)/4)] : size(g1,2))) + bo *0.32 ;

    salidar(11,1:[size(g1,2) - (size(g1,2)/4)])=...
mean(g1(:,1:[size(g1,2) - (size(g1,2)/4)])) + bo *1.166;
    salidar(11,[size(g1,2) - (size(g1,2)/4)] : size(g1,2))=...
mean(g1(:, [size(g1,2) - (size(g1,2)/4)] : size(g1,2))) - bo *0.32;

    salidar(12,1:[size(g1,2) - (size(g1,2)/4)])= mean(g1(:,1:[size(g1,2) -
(size(g1,2)/4)])) - bo *1.166;
    salidar(12,[size(g1,2) - (size(g1,2)/4)] : size(g1,2))= mean(g1(:, [size(g1,2) -
(size(g1,2)/4)] : size(g1,2))) - bo *0.32 ;

    salidar(13,1:((size(g1,2)/2)))= mean(g1(:,1:((size(g1,2)/2)))) + bo *0.5;
    salidar(13,(size(g1,2)/2) : size(g1,2))= mean(g1(:, (size(g1,2)/2) : size(g1,2)))+ bo
*1.284;

    salidar(14,1:((size(g1,2)/2)))= mean(g1(:,1:((size(g1,2)/2)))) - bo *0.5;
    salidar(14,(size(g1,2)/2) : size(g1,2))= mean(g1(:, (size(g1,2)/2) : size(g1,2)))- bo
*1.284;

    salidar(15,1:((size(g1,2)/2)))= mean(g1(:,1:((size(g1,2)/2)))) - bo *0.5;
    salidar(15,(size(g1,2)/2) : size(g1,2))= mean(g1(:, (size(g1,2)/2) : size(g1,2)))+ bo
*1.284;

    salidar(16,1:((size(g1,2)/2)))= mean(g1(:,1:((size(g1,2)/2)))) + bo *0.5;
    salidar(16,(size(g1,2)/2) : size(g1,2))= mean(g1(:, (size(g1,2)/2) : size(g1,2)))- bo
*1.284;

% Calculo del f2 del lote simulado
for i= 1:size(salidar,1);
    Dif= mean(g1)-salidar(i,:);
    S= sum(Dif.^2)/size(Dif,2);
    f22(i)= 50*[log10([[S+1]^(-0.5)]*100)];
end

% Toma de decisión de salvado del lote en base a f2= 50
if (50.1 > mean(f22));
    if (49.9 < mean(f22));
        j= j+1;
        salida(:,j)= salidar;
    end
end

end

```

VI.9. RUTINA PARA EL CÁLCULO DEL NÚMERO ÓPTIMO DE PCs QUE REPRESENTAN UN PERFIL DE DISOLUCIÓN

```

% [disolucion,S_exp_total,f]=prueba_comp(disolucion,grupos,centrado)
%
% Calcula y grafica la variancia explicada por cada factor en una
% SVD(descomposición en valores singulares). Así como también grafica
% y calcula el error residual de la matriz reconstruida.
%
% disolucion= es la matriz de datos disolución(N x M) con N número de s y M
% variables por muestra.
% grupos= es la cantidad de lotes que se encuentran en la matriz
% centrado=1 centra los datos o =0 no centra los datos.
%
function [disolucion,S_exp_total,f]= prueba_comp(disolucion,grupos,centrado)

% Calcula las dimensiones de la matriz de disolución
[Largo,Ancho]= size(disolucion);

if Largo >= Ancho
    BB= Ancho;
else
    BB= Largo;
end

% Realiza el centrado de la matriz, es opcional.
if centrado== 1
    disolucion= disolucion-repmat(mean(disolucion),Largo,1);
end

% Crea un gráfico de la matriz de perfiles de disolución

figure(3);plot(disolucion')
title ('matriz original')

% Realiza la descomposición en valores singulares de la matriz de datos centrados
% o no
[U,S,V]= svd(disolucion',0);

% Reconstruye la matriz con un número creciente de PCs y calcula el error que %
deja afuera la reconstrucción
for i= 1:BB
    disolucion_est= U(:,1:i)*S(1:i,1:i)*V(:,1:i)';
    error= disolucion-disolucion_est';
    f(i)= (sum(sum(error.^2)/(Ancho*Largo))^0.5);
end

% Crea un gráfico del error vs. el número de PCs

```

```

figure(2)
plot(f,'o-');
xlabel('componente nro');
ylabel('error residual');

% Calcula la variancia explicada en cada factor
S_exp= 100*sum(S)/sum(sum(S));
for i= 1:BB;
    S_exp_total(i)= sum(S_exp(1:i));
end

% Crea un gráfico de variancia explicada vs. el número de PCs
figure(2)
plot(S_exp_total,'-o');
xlabel('componente nro');
ylabel('variancia total explicada');
Largo= Largo/grupos;

% Calcula los desvíos de los grupos por separado

for j= 1:grupos
    Dato= [disolucion(Largo*j-Largo+1:Largo*j,:)] ;
    Dato1(j,:)= std(Dato);
end

% Muestra los desvíos calculados para la toma de decisión

disp('desvíos estandar de los grupos');
disp(Dato1)
disp('media del desvío estándar');
disp(mean(Dato1)')
isp(mean(mean(Dato1)))
disp('mínimo del desvío estándar');
disp(min(min(Dato1)))
disp('mínimo de la media desvío estándar');
disp(min(mean(Dato1)))

% Crea gráficos de las cargas (loadings) para la toma de decisión
loa= input('número de cargas a graficar=')
for i= 1:loa;
    figure(3+i)
    plot(U(:,i))
    nros= ['01';'02';'03';'04';'05';'06';'07';'08';'09';'10';'11';'12';'13';...
'14';'15';'16']
    title(['loading ',nros(i,:)])

end

```


CAPÍTULO VII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS SELECTAS

CAPÍTULO VII:

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS SELECTAS

- 1 International Standards Organization (1990). *ISO Guide 25, General Requirements for the Competence of Calibration and Testing Laboratories*, Ginebra, Suiza.
- 2 Juran, J. M.; Gryna, F. M.; Bingham, R. S. (1974). *Quality Control Handbook*. McGraw-Hill, Nueva York, EEUU.
- 3 Sharp, J. R. (1977). *Guide to Pharmaceutical Manufacturing Practice*, 2º Ed. Her Majesty Stationary Office, Londres, Inglaterra.
- 4 a) Comunidad Económica Europea (1991). *Directiva 91/356/CEE, Principios y Directrices de las Prácticas Correctas de Fabricación de los Medicamentos de Uso Humano*. Oficina de Publicaciones Oficiales de la Comunidad Europea, Luxemburgo;
b) Normas sobre Medicamentos de la Unión Europea (1999). Vol. IV: *Normas de Correcta Fabricación. Medicamentos de Uso Humano y Medicamentos Veterinarios*. Oficina de Publicaciones Oficiales de la Comunidad Europea, Luxemburgo.
- 5 The Society of Japanese Pharmacopoeia (2006). *Japanese Pharmacopoeia*, XV Ed. (edición en inglés), Tokio, Japón.
- 6 Organización Mundial de la Salud (1992). *Good Manufacturing Practices for Pharmaceutical Products* en *WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations*. 32º Reporte. Ginebra, Suiza (WHO Technical Report Series N° 823).
- 7 Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina (2003). <1020> *Buenas Prácticas de Fabricación y Control en Farmacopea Argentina*, 7º Ed.; Vol. 1, Imprenta del Congreso de la Nación, Buenos Aires, Argentina.
- 8 Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina (2003). *Farmacopea Argentina*, 7º

- Ed.; Vol. 1, Imprenta del Congreso de la Nación, Buenos Aires, Argentina. p. 39.
- 9 Organización Mundial de la Salud (1975). *Serie de Informes Técnicos. Informe N° 567*. Anexo 1, p. 18, Ginebra, Suiza.
 - 10 Gennaro, A. R.; Gennaro, A. L. (Eds.) (2000). *Remington's Pharmaceutical Sciences, The Science and Practice of Pharmacy*, 18° Ed.; Mack, Plainview, EEUU.
 - 11 Aulton, M. E. (2004). *Farmacia. La Ciencia del Diseño de las Formas Farmacéuticas*. Elsevier, Madrid, España.
 - 12 Gómez Burgaz, M.; García Ochoa, B.; Torrado Santiago, S. (2008) "Chitosan-carboxymethylcellulose interpolymers for gastric-specific delivery of clarithromycin". *Int. J. Pharm.* **359**:135-143.
 - 13 Anicetti, V. R.; Keytand, B. A.; Hancock, W. S. (1989) "Purity analysis of protein pharmaceuticals produced by recombinant DNA technology". *Trends Biotechnol.* **7**:342-349.
 - 14 Carstensen, J. T. (1993). *Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms*. Technomic, Lancaster, EEUU.
 - 15 a) Administración Nacional de Alimentos, Medicamentos y Tecnología Médica (1999) Disposición ANMAT N° 3185/99; b) UEMA (1999) "Recomendaciones de Expertos sobre Bioequivalencia de Productos Farmacéuticos". Caracas, Venezuela; c) Administración Nacional de Alimentos, Medicamentos y Tecnología Médica (2002) "Drogas ordenadas por exigencia, riesgo y ventana terapéutica". *Boletín para Profesionales* **10**(3-4):46.
 - 16 Bevan, J. A. (Ed.) (1972). *Essentials of Pharmacology. Introduction to the Principles of Drug Action*, 2° Ed. Harper & Row, Hagerstown, EEUU.
 - 17 a) Mindel, J. S. (1976) "Bioavailability and genetic prescribing". *Survey Ophthalmol.* **21**:262-275; b) Delalonde, M.; Ruiz, T. (2008) "Dissolution of pharmaceutical tablets: The influence of penetration and drainage of interstitial fluids". *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* **47**:370-376; c) Carrier, R. L.; Miller, L. A.; Ahmed, I. (2008) "The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability". *J. Controll. Rel.* **123**:78-99.

- 18 a) Snider, D. A.; Addicks, W.; Owens, W. (2004) "Polymorphism in generic drug product development". *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **56**:391-395; b) Bauer, J.; Spanton, S.; Henry, R.; Quick, J.; Dziki, W.; Porter, W.; Morris, J. (2001) "Ritonavir: An extraordinary example of conformational polymorphism". *Pharm. Res.* **18**:859-866.
- 19 a) Alvarenga, L.; Ferreira, D.; Altekruze, D.; Menezes, J. C.; Lochmann, D. (2008) "Tablet identification using near-infrared spectroscopy (NIRS) for pharmaceutical quality control". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48**:62-69; b) Rosa, S. S.; Barata, P. A.; Martins, J. M.; Menezes, J. C. (2008) "Development and validation of a method for active drug identification and content determination of ranitidine in pharmaceutical products using near-infrared reflectance spectroscopy: A parametric release approach". *Talanta* **75**:725-733; c) Skorda, D.; Kontoyannis, C. G. (2008) "Identification and quantitative determination of atorvastatin calcium polymorph in tablets using FT-Raman spectroscopy". *Talanta* **74**:1066-1070.
- 20 Grosche, O.; Zeitz, M. (2008) "Role of CE in drug substance and drug product development". *Sep. Sci. Tech.* **9**:95-121.
- 21 a) Argentine, M. D.; Owens, P. K.; Olsen, B. A. (2007) "Strategies for the investigation and control of process-related impurities in drug substances". *Adv. Drug Del. Rev.* **59**:12-28; b) Sheldon, E. M.; Downar, J. B. (2000) "Development and validation of a single robust HPLC method for the characterization of a pharmaceutical starting material and impurities from three suppliers using three separate synthetic routes". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **23**:561-572; c) Altria, K. D. (1996) "Determination of drug-related impurities by capillary electrophoresis". *J. Chromatogr. A* **735**:43-56.
- 22 Bauer, M.; de Leede, L.; Van Der Waart, M. (1998) "Purity as an issue in pharmaceutical research and development". *Eur. J. Pharm. Sci.* **6**:331-335.
- 23 Krstulovic, A. M.; Lee, C. R. (1997) "Defining drug purity through chromatographic and related methods: Current status and perspectives". *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **689**:137-153.
- 24 Camarasu, C.; Madichie, C.; Williams, R. (2006) "Recent progress in the determination of volatile impurities in pharmaceuticals". *Trends Anal. Chem.* **25**:768-777.

- 25 Ferenczi-Fodor, K.; Végh, Z.; Renger, B. (2006) "Thin-layer chromatography in testing the purity of pharmaceuticals". *Trends Anal. Chem.* **25**:778-789.
- 26 a) Nageswara Rao, R.; Kumar Talluri, M. V. N.; Narasa Raju, A.; Shinde, D. D.; Ramanjaneyulu, G. S. (2008) "Development of a validated RP-LC/ESI-MS-MS method for separation, identification and determination of related substances of tamsulosin in bulk drugs and formulations". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **46**:94-103; b) Zhou, L.; Mao, B.; Reamer, R.; Novak, T.; Ge, Z. (2007) "Impurity profile tracking for active pharmaceutical ingredients: Case reports". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **44**:421-429; c) Yasueda, S.-I.; Higashiyama, M.; Shirasaki, Y.; Inada, K.; Ohtori, A. (2004) "An HPLC method to evaluate purity of a steroidal drug, loteprednol etabonate". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **36**:309-316; d) Nageswara Rao, R.; Narasa Raju, A.; Nagaraju, D. (2006) "Development and validation of a liquid chromatographic method for determination of enantiomeric purity of citalopram in bulk drugs and pharmaceuticals". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**:280-285.
- 27 Dejaegher, B.; Bloomfield, M. S.; Smeyers-Verbeke, J.; Vander Heyden, Y. (2008) "Validation of a fluorimetric assay for 4-aminophenol in paracetamol formulations". *Talanta* **75**:258-265.
- 28 Lasdun, A. M.; Kurumbail, R. R.; Leimgruber, N. K.; Rathore, A. S. (2001) "Validatibility of a capillary isoelectric focusing method for impurity quantitation". *J. Chromatogr. A* **917**:147-158.
- 29 Bryant, D. K.; Kingswood, M. D.; Belenguer, A. (1996) "Determination of liquid chromatographic peak purity by electrospray ionization mass spectrometry". *J. Chromatogr. A* **721**:41-51.
- 30 Müller, L.; Mauthe, R. J.; Riley, C. M.; Andino, M. M.; De Antonis, D.; Beels, C.; De George, J.; De Knaep, A. G. M.; Ellison, D.; Fagerland, J. A.; Frank, R.; Fritschel, B.; Galloway, S.; Harpur, E.; Humfrey, C. D. N.; Jacks, A. S.; Jagota, N.; Mackinnon, J.; Mohan, G.; Ness, D. K. (2006) "A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity". *Reg. Toxicol. Pharmacol.* **44**:198-211.

- 31 a) Askal, H. F.; Refaat, I. H.; Darwish, I. A.; Marzouq, M. A. (2008) "A selective spectrophotometric method for determination of rosoxacin antibiotic using sodium nitroprusside as a chromogenic reagent". *Spectrochim. Acta A* **69**:1287-1291; b) Cruz Sarraguça, M.; Almeida Lopes, J. (2008) "Quality control of pharmaceuticals with NIR: From lab to process line". *Vibrat. Spectrosc.* **00**:000-000. doi:10.1016/j.vibspec.2008.07.013; d) El-Didamony, A. M. (2008) "Spectrophotometric determination of benzydamine HCl, levamisole HCl and mebeverine HCl through ion-pair complex formation with methyl orange". *Spectrochim. Acta A* **69**:770-775.
- 32 Radhakrishna, T.; Sreenivas Rao, D.; Om Reddy, G. (2001) "LC determination of rofecoxib in bulk and pharmaceutical formulations". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **26**:617-628.
- 33 a) Ghoneim, M. M.; Abushoffa, A. M.; Moharram, Y. I.; El-Desoky, H. S. (2007) "Voltammetry and quantification of the contraceptive drug norethisterone in bulk form and pharmaceutical formulation". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43**:499-505; b) Srinivasu, M. K.; Narasa Raju, A.; Om Reddy, G. (2002) "Determination of lovastatin and simvastatin in pharmaceutical dosage forms by MEKC". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **29**:715-721.
- 34 Giron, D. (1998) "Contribution of thermal methods and related techniques to the rational development of pharmaceuticals—Part 2". *Pharm. Sci. Tech. Today* **1**:262-268.
- 35 Nageswara Rao, R.; Kumar Talluri, M. V. N. (2007) "An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43**:1-13.
- 36 a) Pastor-Navarro, N.; Gallego-Iglesias, E.; Maquieira, A.; Puchades, R. (2007) "Immunochemical method for sulfasalazine determination in human plasma". *Anal. Chim. Acta* **583**:377-383; b) Geng, D.; Shankar, G.; Schantz, A.; Rajadhyaksha, M.; Davis, H.; Wagner, C. (2005) "Validation of immunoassays used to assess immunogenicity to therapeutic monoclonal antibodies". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **39**:364-375; c) Findlay, J. W. A.; Smith, W. C.; Lee, J. W.; Nordblom, G. D.; Das, I.; De Silva, B. S.; Khan, M. N.; Bowsher, R. R. (2000) "Validation of

- immunoassays for bioanalysis: A pharmaceutical industry perspective". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **21**:1249-1273.
- 37 a) Robinson, J. (2003) "Bioassays - a continuously developing field". *Drug Discov. Today* **8**:676-678; b) Harwood, G. W. J.; Pouton, C. W. (1996) "Amperometric enzyme biosensors for the analysis of drugs and metabolites". *Adv. Drug Deliv. Rev.* **18**:163-191; c) Buck, R. H.; Cholewinski, M.; Maxl, F. (1991) "Animal test or chromatography?: Validated high-performance liquid chromatography assay as an alternative to the biological assay for ornipressin". *J. Chromatogr. A* **548**:335-341; d) Salgado, H. R. N.; Lopes, C. C. G. O.; Lucchesi, M. B. B. (2006) "Microbiological assay for gatifloxacin in pharmaceutical formulations". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40**:443-446; e) Mendez, A. S. L.; Weisheimer, V.; Oppe, T. P.; Steppe, M.; Schapoval, E. E. S. (2005) "Microbiological assay for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **37**:649-653.
- 38 a) Vignaduzzo, S. E.; Castellano, P. M.; Kaufman, T. S. (2008) "Method development and validation for the simultaneous determination of meloxicam and pridinol mesylate using RP-HPLC and its application in drug formulations". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **46**:219-225; b) Dongre, V. G.; Karmuse, P. P.; Prakasa Rao, P.; Kumar, A. (2008) "Development and validation of UPLC method for determination of primaquine phosphate and its impurities". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **46**:236-242; c) Joseph-Charles, J.; Geneste, C.; Laborde-Kummer, E.; Gheyouche, R.; Boudis, H.; Dubost, J.-P. (2007) "Development and validation of a rapid HPLC method for the determination of oseltamivir phosphate in Tamiflu[®] and generic versions". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **44**:1008-1013.
- 39 Kazarian, S. G.; Kong, K. W. T.; Bajomo, M.; Van Der Weerd, J.; Chan, K. L. A. (2005) "Spectroscopic imaging applied to drug release". *Food Bioprod. Process.* **83**:127-135.
- 40 Graffner, C. (2006) "Regulatory aspects of drug dissolution from a European perspective". *Eur. J. Pharm. Sci.* **29**:288-293.
- 41 Roggo, Y.; Jent, N.; Edmond, A.; Chalus, P.; Ulmschneider, M. (2005) "Characterizing process effects on pharmaceutical solid forms using near-infrared spectroscopy and infrared imaging". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **61**:100-110.

- 42 a) Costa, P.; Sousa Lobo, J. M. (2001) "Modeling and comparison of dissolution profiles". *Eur. J. Pharm. Sci.* **13**:123-133; b) Qazi, S.; Samuel, N. K.; Venkatachalam, T. K.; Uckun, F. M. (2003) "Evaluating dissolution profiles of an anti-HIV agent using ANOVA and non-linear regression models in JMP software". *Int. J. Pharm.* **252**:27-39; c) Costa, F. O.; Sousa, J. J. S.; Pais, A. A. C. C.; Formosinho, S. J. (2003) "Comparison of dissolution profiles of ibuprofen pellets". *J. Controll. Rel.* **89**:199-212.
- 43 Yuksel, N.; Kanık, A. E.; Baykara, T. (2000) "Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and-independent methods". *Int. J. Pharm.* **209**:57-67.
- 44 Zick, F.; Fischer, M.; Gulden, B. (2000) "Robotic and automated systems in the pharmaceutical QC". *J. Assoc. Lab. Automat.* **5**:40-43.
- 45 a) Baxter, J. L.; Kukura, J.; Muzzio, F. J. (2005) "Hydrodynamics-induced variability in the USP apparatus II dissolution test". *Int. J. Pharm.* **292**:17-28; b) Wahtman Group (2005) "Filters improve tablet dissolution test". *Membrane Technol.* **4**.
- 46 Moore, J. W.; Flanner, H. H. (1996) "Mathematical comparison of dissolution profiles". *Pharm. Technol.* **20**:64-74.
- 47 Skrdla, P. J. (2007) "A simple model for complex dissolution kinetics: A case study of norfloxacin". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **45**:251-256.
- 48 Polli, J. E.; Rekhi, G. S.; Augsburger, J. J.; Shah, V. P. (1997) "Methods to compare dissolution profiles and a rationale for wide dissolution specifications for metoprolol tartrate tablets". *J. Pharm. Sci.* **86**:690-700.
- 49 Dressman, J.; Krämer, J. (Eds.) (2005). *Pharmaceutical Dissolution Testing*. Taylor & Francis, Nueva York, EEUU.
- 50 O'Hara, T.; Dunne, A.; Butler, J.; Devane, J. (1998) "A review of methods used to compare dissolution profile data". *Pharm. Sci. Technol. Today* **1**:214-223.
- 51 Ju, H. L.; Liaw, S.-J. (1997) "On the assessment of similarity of drug dissolution profiles- a simulation study". *Drug Inf. J.* **31**:1273-1289.

- 52 a) Szasz, G.; Budvari Barany, Z.; Gyimesi Forras, K (1999) "Optimized and validated HPLC methods for compendial quality assessment. IV. non-chiral and chiral purity tests for Solanaceous (tropane) alkaloids". *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **22**:747-759; b) Grigor'ev, A. M.; Vysochina, L. A.; Staroverov, V. M.; Deineka, V. I.; Vysochin, A. P.; Helova, V. M. (1992) "HPLC control of vitamin B₁ synthesis". *Zh. Anal. Khim.* **47**:1904-1909; c) Smahi, Z.; Huvenne, J. P.; Traisnel, M. (1992) "Simple methods validation by HPLC for the determination of degradation products in essential drugs in tablets". *Ann. Pharm. Fr.* **50**:167-176; d) Cizmarik, J.; Subert, J.; Vespalec, R. (1989) "High-performance liquid column chromatography in the pharmacopoeial quality control of drugs". *Acta Fac. Pharm. Univ. Comenianae* **41**:4259-4285.
- 53 a) Sane, R. T.; Joshi, S. G.,; Francis, M.; Khatri, A. R.; Hijli, P. S. (1999) "Extractive colorimetric determination of azelastine hydrochloride from its pharmaceutical preparation". *Indian Drugs* **36**:317-320; b) Arya, S. P.; Mahajan, M. (1997) "Colorimetric determination of ascorbic acid in pharmaceutical preparations and biological samples". *Mikrochim. Acta* **127**:45-49.
- 54 a) Taha, A. M.; El-Rabbat, N. A.; Abdel-Fattah, F. (1980) "Spectrophotometric assay of hexamethylenetetramine [hexamine]". *Analyst* **105**:568-574; b) Prabhakar, A. H.; Patel, V. B.; Giridhar, R. (1999) "Spectrophotometric determination of fluoxetine hydrochloride in bulk and in pharmaceutical formulations". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **20**:427-432.
- 55 Lopez-Erroz, C.; Vinas, P.; Campillo, N.; Hernandez-Cordoba, M. (1996) "Flow injection-fluorometric method for the determination of ranitidine in pharmaceutical preparations using *o*-phthalaldehyde". *Analyst* **121**:1043-1046.
- 56 a) General Medical Council (1953). *British Pharmacopoeia 1953*. The Pharmaceutical Press, Londres, Inglaterra; b) Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos (1950). *Farmacopea de los Estados Unidos de América, Décimocuarta Revisión (U.S.P. XIV)*, Editorial Interamericana S.A., México, México; traducida por Folch, P. I.; Dominguez, O. H.
- 57 a) Tarantilis, P. A.; Troianou, V. E.; Pappas, C. S.; Kotseridis, Y. S.; Polissiou, M. G. (2008) "Differentiation of Greek red wines on the basis of grape variety using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy". *Food Chem.*

- 111:192-196; b) Kuligowski, J.; Quintás, G.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. (2008) "Determination of lecithin and soybean oil in dietary supplements using partial least squares-Fourier transform infrared spectroscopy". *Talanta* **77**:229-234; c) Moros, J.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. (2007) "Quality control Fourier transform infrared determination of diazepam in pharmaceuticals". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43**:1277-1282; d) Boyer, C.; Brégère, B.; Crouchet, S.; Gaudin, K.; Dubost, J. P. (2006) "Direct determination of niflumic acid in a pharmaceutical gel by ATR/FT-RI spectroscopy and PLS calibration". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40**:433-437; e) Wartewig, S.; Neubert, R. H. H. (2005) "Pharmaceutical applications of Mid-IR and Raman spectroscopy". *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**:1144-1170.
- 58 Masmoudi, H.; Le Dréau, Y.; Piccerelle, P.; Kister, J. (2005) "The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FT-IR". *Int. J. Pharm.* **289**:117-131.
- 59 Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina (2003) <1130> *Validación de Métodos Analíticos en Farmacopea Argentina*, 7º Ed.; Vol. 1, Imprenta del Congreso de la Nación, Buenos Aires, Argentina.
- 60 USP Convention (2007). *The United States Pharmacopoeia 30. The National Formulary 25*. Rockville, EEUU.
- 61 Epshtein, N. A. (2004) "Validation of HPLC techniques for pharmaceutical analysis". *Pharm. Chem. J.* **38**:212-228.
- 62 Olivieri, A. C.; Faber, K. M.; Ferré, J.; Boqué, R.; Kalivas, J. H.; Mark, H. (2006) "Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration". *Pure Appl. Chem.* **78**:633-661.
- 63 Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Deming, S. N.; Michotte, Y.; Kaufman, L. (1988). *Chemometrics: A Textbook*. Elsevier, Amsterdam, Holanda, p. 6.
- 64 a) Berridge, J. C.; Jones, P.; Roberts-McIntosh, A. S. (1991) "Chemometrics in pharmaceutical analysis". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **9**:597-604; b) Roggo, Y.; Chalus, P.; Maurer, L.; Lema-Martínez, C.; Edmond, A.; Jent, N. (2007) "A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies". *J. Pharm. Biomed.*

- Anal* **44**:683-700; c) Doherty, S. J.; Lange, A. J. (2006) "Avoiding pitfalls with chemometrics and PAT in the pharmaceutical and biotech industries". *Trends Anal. Chem.* **25**:1097-1102; d) Ni, Y.; Kokot, S. (2008) "Does chemometrics enhance the performance of electroanalysis?". *Anal. Chim. Acta* **626**:130-146; e) Gendrin, C.; Roggo, Y.; Collet, C. (2008) "Pharmaceutical applications of vibrational chemical imaging and chemometrics: A review". *J. Pharm. Biomed. Anal* **48**:533-553; f) Xu, L.; Tang, L.-J.; Cai, C.-B.; Wu, H.-L.; Shen, G.-L.; Yu, R.-Q.; Jiang, J.-H. (2008) "Chemometric methods for evaluation of chromatographic separation quality from two-way data—A review". *Anal. Chim. Acta* **613**:121-134; g) Alam, T. M.; Alam, M. K. (2004) "Chemometric analysis of NMR spectroscopy data: A Review". *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **54**:41-80.
- 65 Piao, X.-L.; Park, J. H.; Cui, J.; Kim, D.-H.; Yoo, H. H. (2007) "Development of gas chromatographic/mass spectrometry-pattern recognition method for the quality control of Korean Angelica". *J. Pharm. Biomed. Anal* **44**:1163-1167; b) Urbano, M.; Luque de Castro, M. D.; Pérez, P. M.; García-Olmo, J.; Gómez-Nieto, M. A. (2006) "Ultraviolet-visible spectroscopy and pattern recognition methods for differentiation and classification of wines". *Food Chem.* **97**:166-175; c) Realpe, A.; Velázquez, C. (2006) "Pattern recognition for characterization of pharmaceutical powders". *Powder Technol.* **169**:108-113; d) Scott, D. R. (1994) "Pattern recognition/expert system for identification of toxic compounds from low resolution mass spectra". *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **23**:351-364.
- 66 Rosenfeld, A. (1969) "Pictorial pattern recognition". *Biosystems* **3**:211-220.
- 67 Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; MasPOCH, S.; De la Pezuela, C. (1994) "Control analysis of a pharmaceutical preparation by near-infrared reflectance spectroscopy : A comparative study of a spinning module and fibre optic probe". *Anal. Chim. Acta* **298**:183-191.
- 68 Mark, H. (2002). *Qualitative Discriminant Analysis* en Burns, D. A.; Ciurczac, E. (Eds.) *Handbook of Near Infrared Analysis*, Marcel Dekker, Nueva York, EEUU, Capítulo 13.
- 69 a) Xu, D.; Redman-Furey, N. (2007) "Statistical cluster analysis of pharmaceutical solvents". *Int. J. Pharm.* **339**:175-188; b) Bratchell, N. (1989) "Cluster analysis". *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **6**:105-125.

- 70 Strouf, O. (1986) *Chemical Pattern Recognition*. Research Studies Press LTD, Letchworth, Hertfordshire, Inglaterra.
- 71 a) Bianchi, D.; Calogero, R.; Tirozzi, B. (2007) "Kohonen neural networks and genetic classification". *Math. Computer Mod.* **45**:34-60; b) Capitán-Vallvey, L. F.; Navas, N.; del Olmo, M.; Consonni, V.; Todeschini, R. (2000) "Resolution of mixtures of three nonsteroidal anti-inflammatory drugs by fluorescence using partial least squares multivariate calibration with previous wavelength selection by Kohonen artificial neural networks". *Talanta* **52**:1069-1079.
- 72 Derde, M. P.; Massart, D. L. (1986) "Supervised pattern recognition: The ideal method?". *Anal. Chim. Acta* **191**:1-16.
- 73 a) Coomans, D.; Massart, D. L. (1982) "Alternative K-nearest neighbour rules in supervised pattern recognition. Part 1: K-nearest neighbour classification by using alternative voting rules". *Anal. Chim. Acta* **136**:15-27; b) Coomans, D.; Massart, D. L. (1982) "Alternative K-nearest neighbour rules in supervised pattern recognition. Part 2. Probabilistic classification on the basis of the kNN method modified for direct density estimation". *Anal. Chim. Acta* **138**:153-165.
- 74 Juricksay, I.; Veress, G. E. (1981) "PRIMA: A new pattern recognition method". *Anal. Chim. Acta* **171**:61-76.
- 75 a) Derde, M. P.; Massart, D. L. (1986) "UNEQ: A disjoint modelling technique for pattern recognition based on normal distribution". *Anal. Chim. Acta* **184**:33-51; b) Ortiz Fernández, M. C.; Herrero Gutiérrez, A.; Sánchez Pastor, M. S.; Sarabia, L. A.; Íñiguez Crespo, M. (1995) "The UNEQ, PLS and MLF neural network methods in the modelling and prediction of the colour of young red wines from the denomination of origin 'Rioja'". *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **28**:273-285.
- 76 a) Gemperline, P. J.; Webber, L. D. (1989) "Raw materials testing using soft independent modeling of class analogy analysis of near infrared reflectance spectra". *Anal. Chem.* **61**:138-144; b) Candolfi, A.; De Maesschalck, R.; Massart, D. L.; Hailey, P. A.; Harrington, A. C. E. (1999) "Identification of pharmaceutical excipients using NIR spectroscopy and SIMCA". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **19**:923-935.

- 77 a) Bertran, E.; Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; Montoliu, I. (2000) "Near infrared spectrometry and pattern recognition as screening methods for the authentication of virgin olive oils of very close geographical origins". *J. Near Infrared Spectrosc.* **8**:45-52; b) Agatonovic-Kustrin, S.; Beresford, R. (2000) "Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **22**:717-727.
- 78 a) Jackson, J. E. (1991). *User's Guide to Principal Components*. Wiley, Nueva York, EEUU; b) Wold, S.; Esbensen, K.; Geladi, P. (1987) "Principal component analysis". *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2**:37-52.
- 79 a) Madrakian, T.; Afkhami, A.; Moein, R.; Bahram, M. (2007) "Simultaneous spectrophotometric determination of Sn(II) and Sn(IV) by mean centering of ratio kinetic profiles and partial least squares methods". *Talanta* **72**:1847-1852; b) Bahram, M. (2007) "Mean centering of ratio spectra as a new method for determination of rate constants of consecutive reactions". *Anal. Chim. Acta* **603**:13-19.
- 80 a) Geladi, P.; Kowalski, B. R. (1985) "Partial least-squares regression: A tutorial". *Anal. Chim. Acta* **185**:1-17; b) Blanco, M.; Boqué, R.; Cela, R.; Coello, J.; Maspoch, S.; Ortiz, M. C.; Riba, J.; Rius, F. X.; Ruiz, A.; Sarabia, L. A.; Tomás, X. (1991). *Avances en quimiometría práctica*. Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España; c) Gao, J.; Kwan, P. W.; Guo, Y. (2008) "Robust multivariate L1 principal component analysis and dimensionality reduction". *Neurocomputing* **00**:000-000. doi:10.1016/j.neucom.2008.01.027.
- 81 De Maesschalck, R.; Jouan-Rimbaud, D.; Massart, D. L. (2000) "The Mahalanobis distance". *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **50**:1-18.
- 82 a) Johnson, R. A.; Wichern, D. W. (1999). *Applied Multivariate Statistical Analysis*, 4^o Ed., Prentice Hall, Nueva Jersey, EEUU.
- 83 a) Eckart, C.; Young, G. (1936) "The approximation of one matrix by another of lower rank". *Psychometrika* **1**:211-218; b) Wall, M. E.; Rechtsteiner, A.; Rocha, L. M. (2003). *Singular Value Decomposition and Principal Component Analysis en A Practical Approach to Microarray Data Analysis*. Berrar, D. P.; Dubitzky, W.; Granzow, M.

- (Eds.), Kluwer, Norwell, EEUU, pp. 91-109; c) Gerbrands, J. J. "On the relationships between SVD, KLT and PCA". *Patt. Recognit.* **14**:375-381.
- 84 a) Broderick, A. Y.; Paris, J.; Valade, J. L. (1995) "A composite representation of pulp quality". *Chemomet. Intell. Lab. Syst.* **29**:19-28; b) Vandeginste, B. G. M.; Sielhorst, C.; Gerritsen, M. (1988) "The NIPALS algorithm for the calculation of the principal components of a matrix". *Trends Anal. Chem.* **7**:286-287.
- 85 Bicciato, S.; Luchini, A.; Di Bello, C. (2003) "PCA disjoint models for multiclass cancer analysis using gene expression data". *Bioinformatics* **19**:571-578.
- 86 Kohonen, T. (1982) "Self-organized formation of topologically correct feature maps". *Biol. Cybernet.* **43**:59-69.
- 87 Antônia da Silva, G.; Augusto, F.; Poppi, R. J. (2008) "Exploratory analysis of the volatile profile of beers by HS-SPME-GC". *Food Chem.* **111**:1057-1063.
- 88 Kohonen, T. (2001). *Self-Organizing Maps*, 3^o Ed. en *Springer Series in Information Sciences*, Vol. 30, Springer, Berlín, Alemania.
- 89 a) Ingle, J. D. J.; Crouch, S. R. (1988). *Spectrochemical Analysis*. Prentice Hall, Nueva Jersey, EEUU; b) Newman, J. (1967) "The koutecký correction to the ilkovič equation". *J. Electroanal. Chem.* **15**:309-312.
- 90 Benamor, M.; Aguerssif, N. (2008) "Simultaneous determination of calcium and magnesium by derivative spectrophotometry in pharmaceutical products". *Spectrochim. Acta A* **69**:676-681; b) Dave, N.; Mashru, R. C.; Thakkar, A. R. (2007) "Simultaneous determination of salbutamol sulphate, bromhexine hydrochloride and etofylline in pharmaceutical formulations with the use of four rapid derivative spectrophotometric methods". *Anal. Chim. Acta* **597**:113-120.
- 91 a) Zachariassen, C. B.; Larsen, J.; van den Berg, F.; Balling Engelsen, S. (2005) "Use of NIR spectroscopy and chemometrics for on-line process monitoring of ammonia in Low Methoxylated Amidated pectin production". *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **76**:149-161; b) Mendes, L. S.; Oliveira, F. C. C.; Suarez, P. A. Z.; Rubim, J. C. (2003) "Determination of ethanol in fuel ethanol and beverages by Fourier transform (FT)-near infrared and FT-Raman spectrometries". *Anal. Chim. Acta* **493**:219-231; c) da Costa Filho, P. A.;

- Poppi, R. J. (2001) "Determination of triglycerides in human plasma using near-infrared spectroscopy and multivariate calibration methods". *Anal. Chim. Acta* **446**:39-47.
- 92 a) Savitzky, A.; Golay, M. J. E. (1964) "Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures". *Anal. Chem.* **36**:1627-1639; b) Steinier, J.; Termonia, Y.; Deltour, J. (1972) "Comments on smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures". *Anal. Chem.* **44**:1906-1909; c) Luo, J.; Ying, K.; Bai, J. (2005) "Savitzky-Golay smoothing and differentiation filter for even number data". *Signal Process* **85**:1429-1434; d) Kitamura, K.; Hozumi, K. (1987) "Effect of Savitzky—Golay smoothing on second-derivative spectra". *Anal. Chim. Acta* **201**:301-304; e) Kitamura, K.; Hozumi, K. (1985) "Effect of the degree of polynomials in the Savitzky—Golay method for calculation of second-derivative spectra". *Anal. Chim. Acta* **172**:111-118.
- 93 a) Tahboub, Y. R.; Pardue, H. L. (1985) "Evaluation of multi-wavelength first-and second-derivative spectra for the quantitation of mixtures of polynuclear aromatic hydrocarbons". *Anal. Chem.* **57**:38-41; b) Rossi, D. T.; Pardue, H. L. (1985) "Effects of wavelength range on the simultaneous quantitation of polynuclear aromatic hydrocarbons with absorption spectra". *Anal. Chim. Acta* **175**:153-156.
- 94 El-Gindy, A.; Emara, S.; Hadad, G. M. (2004) "Determination of certain drugs in binary mixtures formulations by second derivative ratio spectrophotometry and LC". *Farmaco* **59**:703-712; b) Yeow, Y. L.; Azali, S.; Ow, S. Y.; Wong, M. C. L.; Leong, Y.-K. (2005) "Evaluating the third and fourth derivatives of spectral data". *Talanta* **68**:156-164; c) Dziuba, J.; Natecz, D.; Minkiewicz, P. (2001) "Reversed-phase high-performance liquid chromatography on-line with the second and fourth derivative ultraviolet spectroscopy as a tool for identification of milk proteins". *Anal. Chim. Acta* **449**:243-252; d) Antonov, L. (1997) "Fourth derivative spectroscopy-a critical view". *Anal. Chim. Acta* **349**:295-301.
- 95 a) Morelli, B. (2003) "Derivative spectrophotometry in the analysis of mixtures of cefotaxime sodium and cefadroxil monohydrate". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32**:257-267; b) Ragno, G.; Ioele, G.; De Luca, M.; Garofalo, A.; Grande, F.; Risoli, A. (2006) "A critical study on the application of the zero-crossing derivative spectrophotometry to the photodegradation monitoring of lacidipine". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **42**:39-45.

- 96 a) Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspocho, S. Alaoui-Ismaili, S. (1997) "UV-spectrophotometric determination of ketoprofen and paraben in a gel preparation by partial least-squares calibration". *Fresenius' J. Anal. Chem.* **357**:967-972; b) Salinas, F.; Espinosa Mansilla, A.; Lopez de Alba, P. L. (1995) "Multivariate prediction by using conventional and derivative partial least-squares statistics in a complex chemical system. Ternary metals mixture resolution". *Anal. Lett.* **28**:193-205.
- 97 a) El-Gindy, A.; Ashour, A.; Abdel-Fattah, L.; Shabana, M. M. (2001) "Spectrophotometric determination of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide in binary mixture using second derivative, second derivative of the ratio spectra and chemometric methods". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **25**:299-307; b) Mahgoub, H.; Gazy, A. A.; El-Yazbi, F. A.; El-Sayed, M. A.; Youssef, R. M. (2003) "Spectrophotometric determination of binary mixtures of pseudoephedrine with some histamine H1-receptor antagonists using derivative ratio spectrum method". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **31**:801-809.
- 98 Booksh, K. S.; Kowalski, B. R. (1994) "Theory of analytical chemistry". *Anal. Chem.* **66**:782-791.
- 99 Olivieri, A. C. (2001). *Calibración Multivariada. Introducción a la Programación con Matlab*, 1º Ed. Ediciones Científicas Argentinas. Buenos Aires, Argentina, p. 7.
- 100 Escandar, G. M.; Damiani, P. C.; Goicoechea, H. G.; Olivieri, A. C. (2006) "A review of multivariate calibration methods applied to biomedical analysis". *Microchem. J.* **82**:29-42.
- 101 Wold, H. (1975). *Soft Modelling by Latent Variables; the Non-Linear Iterative Partial Least Squares Approach en Perspectives in Probability and Statistics*. Academic Press, Londres, Inglaterra.
- 102 a) Escandar, G. M.; Damiani, P. C.; Goicoechea, H. C.; Olivieri, A. C. (2006) "A review of multivariate calibration methods applied to biomedical analysis"; *Microchem. J.* **82**:29-42; b) Escandar, G. M.; Damiani, P. C.; Goicoechea, H. C.; Olivieri, A. C. (2005) "Multivariate calibration: A powerful tool in pharmaceutical analysis". *Curr. Pharm. Anal.* **1**:145-154.

- 103 a) Donachie, A.; Walmsley, A. D.; Haswell, S. J. (1999) "Application and comparisons of chemometric techniques for calibration modelling using electrochemical/ICP MS data for trace elements in UHQ water and humic acid matrices". *Anal. Chim. Acta* **378**:235-243; b) Blanco, M.; Coello, J.; Elaamrani, M.; Iturriaga, H.; MasPOCH, S. (1996) "Partial least-squares regression for the quantitation of pharmaceutical dosages in control analyses". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **15**:329-338; c) Espinosa-Mansilla, A.; Durán-Merás, I.; Salinas, F. (1998) "Simultaneous determination of pteridines in multicomponent mixtures using derivative spectrophotometry and partial least-squares calibration". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**:1325-1334; d) Collado, M. S.; Mantovani, V. E.; Goicoechea, H. C.; Olivieri, A. C. (2000) "Simultaneous spectrophotometric-multivariate calibration determination of several components of ophthalmic solutions: phenylephrine, chloramphenicol, antipyrine, methylparaben and thimerosal". *Talanta* **52**:909-920; e) Bautista, R. D.; Jimenez, A. I.; Jimenez, F. Arias, J. J. (1996) "Simultaneous determination of diazepam and pyridoxine in synthetic mixtures and pharmaceutical formulations using graphical and multivariate calibration-prediction methods". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **15**:183-192; f) Ramos Martos, N.; Molina Díaz, A.; Navalón, A.; de Orbe Payá, I.; Capitán Vallvey, L. F. (2000) "Simultaneous spectrofluorimetric determination of (acetyl)salicylic acid, codeine and pyridoxine in pharmaceutical preparations using partial least-squares multivariate calibration". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **23**:837-844; g) Sena, M. M.; Fernandes, J. C. B.; Rover, Jr., L.; Poppi, R. J.; Kubota, L. T. (2000) "Application of two and three-way chemometric methods in the study of acetylsalicylic acid and ascorbic acid mixtures using ultraviolet spectrophotometry". *Anal. Chim. Acta* **409**:159-170.
- 104 Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Buydens, L. M. C.; de Jong, S.; Lewi, P. J. Smeyers-Verbeke, J. (1998). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part A*. Elsevier, Amsterdam, Holanda.
- 105 Haaland, D. M.; Thomas, E. V. (1988) "Partial least-squares methods for spectral analyses. I. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information". *Anal. Chem.* **60**:1193-1202.
- 106 Faber, K.; Kowalski, B. R. (1997) "Improved prediction-error estimates for multivariate calibration by correcting for the measurement error in the reference values". *Appl. Spectrosc.* **51**:660-665.

- 107 Wang, Y.; Xiang, B. (2007) "Radial basis function network calibration model for near-infrared spectra in wavelet domain using a genetic algorithm". *Anal. Chim. Acta* **602**:55-65.
- 108 Han, Q. J.; Wu, H. L.; Cai, C. B.; Xu, L.; Qin, R. (2008) "An ensemble of Monte Carlo uninformative variable elimination for wavelength selection". *Anal. Chim. Acta* **612**:121-125.
- 109 Rao, R.; Lakshminarayanan, S. (2007) "Variable interaction network based variable selection for multivariate calibration". *Anal. Chim. Acta* **599**:24-35.
- 110 Bogomolov, A.; Hachey, M. (2007) "Application of SIMPLISMA purity function for variable selection in multivariate regression analysis: A case study of protein secondary structure determination from infrared spectra". *Chemomet. Intell. Lab. Syst.* **88**:132-142.
- 111 Leardi, R. (2007) "Genetic algorithms in chemistry". *J. Chromatogr. A* **1158**:226-233.
- 112 Du, Y. P.; Liang, Y.Z.; Jiang, J.H.; Berry, R.J.; Ozaki, Y. (2004) "Spectral regions selection to improve prediction ability of PLS models by changeable size moving window partial least squares and searching combination moving window partial least squares". *Anal. Chim. Acta* **501**:183-191.
- 113 Martens, H.; Naes, T. (1989). *Multivariate Calibration*. Wiley, Chichester, Inglaterra.
- 114 a) Lalljie, S. P. D.; Begona-Barroso, M.; Steenackers, D.; Alonso, R. M.; Jimenez, RM.; Sandra, P. (1997) "Micellar electrokinetic chromatography as a fast screening method for the determination of the doping agents furosemide and piretanide in urine". *J. Chromatogr. B:Biomed. Appl.* **688**:71-78; b) Stanker, L. H.; Muldoon, M. T.; Buckley, S. A.; Braswell, C.; Kamps-Holtzapple, C.; Beier, R. C. (1996) "Development of a monoclonal antibody-based immunoassay to detect furosemide in cow's milk". *J. Agric. Food Chem.* **44**:2455-2459.
- 115 Fisher, R. A. (1926). *The Design of Experiments*. Oliver & Boyd, Edimburgo, Inglaterra.
- 116 Box, G. P. E.; Wilson, K. B. (1951) "On the experimental attainment of optimum conditions". *J. Royal Stat. Soc. Ser. B* **13**:1.

- 117 a) Matthews, R. W.; Scully, C. M.; Levers, B. G. (1984) "The efficacy of diclofenac sodium (Voltarol) with and without paracetamol in the control of post-surgical dental pain". *Br. Dent. J.* **157**:357-359; b) Breivik, E. K.; Barkvoll, P.; Skovlund, E. (1999) "Combining diclofenac with acetaminophen or acetaminophen-codeine after oral surgery: A randomized, double-blind single-dose study". *Clin. Pharmacol. Ther.* **66**:625-635; c) Hiller, A.; Silvanto, M.; Savolainen, S.; Tarkkila, P. (2004) "Propacetamol and diclofenac alone and in combination for analgesia after elective tonsylectomy". *Acta Anaesthesiol. Scand.* **48**:213-218; d) Ward, M.C.; Kirwan, J. R.; Norris, P.; Murray, N. (1986) "Paracetamol and diclofenac in the painful shoulder syndrome". *Br. J. Rheumatol.* **25**:412-420.
- 118 Sussman, G. L.; Mason, J.; Compton, D.; Stewart, J.; Ricard, N. (1999). *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**:100-106.
- 119 Martindale, J. (2006). *The Complete Drug Reference*, 35° Ed. Pharmaceutical Press, Londres, Inglaterra.
- 120 Naidoo, D.; Sareli, P.; Marin, F.; Aroca-Martinez, G.; Maritz, F.; Jardim, P. (1999) "Increased efficacy and tolerability with losartan plus hydrochlorothiazide in patients with uncontrolled hypertension and therapy-related symptoms receiving two monotherapies". *Adv. Ther.* **16**:187-199.
- 121 Brunton, L. L. (Ed.); (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11° Ed. McGraw-Hill, Nueva York, EEUU.
- 122 a) Vander Elst, S. L.; Dombey, J. L.; Vlassak, W. (1981) "Controlled comparison of the effects of furosemide and hydrochlorothiazide added to propranolol in the treatment of hypertension". *Am. Heart J.* **102**:734-740; b) Materson, B. J. (1996) "Lessons from combination therapy in VA studies". *Am. J. Hypert.* **9**:199.
- 123 Stevens, J. D.; Mullane, J. F. (1982) "Propranolol-hydrochlorothiazide combination in essential hypertension". *Clin. Ther.* **4**:497-509.
- 124 Rossi S. (Ed.) (2008). *Australian Medicines Handbook*, 9° Ed. Adelaide, Australia.
- 125 Matsuda, Y.; Tatsumi, E. (1990) "Physicochemical characterization of furosemide modifications". *Int. J. Pharm.* **60**:11-26.

- 126 a) Threlfall, T. L. (1995) "Analysis of organic polymorphs. A review". *Analyst* **120**:2435-2460; b) Wedd, M. W.; Price, C. J.; York, P.; Maginn, S. J.; Mullin, J. W. P. (1993) "The role of particle characterization in industrial crystallization". *Anal. Proc.* **30**:447-456.
- 127 a) Aguiar, A. J.; Krc, J.; Kinkel, A. W.; Samyn, J. C. (1967) "Effect of polymorphism on the absorption of chloramphenicol from chloramphenicol palmitate". *J. Pharm. Sci.* **56**:847-853; b) Aguiar, A. J.; Zelmer, J. E. (1969) "Dissolution behavior of polymorphs of chloramphenicol palmitate and mefenamic acid". *J. Pharm. Sci.* **58**:983-987.
- 128 Bendini, A.; Cerretani, L.; Carrasco-Pancorbo, A.; Gómez-Caravaca, A. M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Lercker, G. (2007) "Phenolic molecules in virgin olive oils: A survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. an overview of the last decade". *Molecules* **12**:1679-1719.
- 129 Her Majesty Stationary Office (2007). *British Pharmacopoeia 2007*, Edición en CD-ROM. Londres, Inglaterra.
- 130 Uceda, M.; Hermoso, M. (1999). *La Calidad del Aceite de Oliva en El Cultivo del Olivo*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España, p. 571.
- 131 FAO Food Nutr. Ser. (1978). *Dietary Fats and Oils in Human Nutrition*. Food and Agriculture Organization (FAO), Roma, Italia.
- 132 Sinelli, N.; Cosio, M. S.; Gigliotti, C.; Casiraghi, E. (2007) "Preliminary study on application of mid infrared spectroscopy for the evaluation of the virgin olive oil 'freshness'". *Anal. Chim. Acta* **598**:128-134.
- 133 a) E.C. Off. J. Eur. Communities. *Regulation 2568/1991*, 11 July 1991; b) COI/T.15/NC no. 2/REV. 10, 2001.
- 134 a) Sklan, D.; Tenne, Z.; Budowski, P. (1983) "The effect of dietary fat and tocopherol on lipolysis and oxidation in turkey meat stored at different temperatures". *Poultry Sci.* **62**:2017-2021; b) Doelman, C. J. en Emerit, I.; Anclair, C. (Eds.) (1989). *Antioxidant Therapy and Preventive Medicine*. Plenum Press, Nueva York, EEUU, p. 9.

- 135 Nesaretnam, K.; Guthrie, N.; Chambers, A. F.; Carroll, K. K. (1995) "Effect of tocotrienols on the growth of a human breast cancer cell line in culture". *Lipids* **30**:1139-1143.
- 136 Giovannini, C.; Straface, E.; Modesti, D.; Coni, E.; Cantafora, A.; De Vincenzi, M.; Malorni, W.; Masella, R. (1999) "Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized-LDL-induced injury in Caco-2 cells". *J. Nutr.* **129**:1269-1277.
- 137 Miró-Casas, E.; Covas, M.; Fitó, M.; Farré-Albadalejo, M.; Marrugat, J.; de la Torre, R. (2003). "Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans". *Eur. J. Clin. Nutr.* **57**:186-190.
- 138 Gutiérrez-Rosales, F.; Ríos, J. J.; L. Gómez-Rey, M. L. (2003) "Main polyphenols in the bitter taste of virgin olive oil. Confirmation by on-line chromatography electrospray ionization mass spectrometry". *J. Agric. Food Chem.* **51**:6021-6025.
- 139 a) Servili, M.; Montedoro, G. F. (2002) "Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality". *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **104**:602-613; b) Velasco, J.; Dobarganes, C. (2002) "Oxidative stability of virgin olive oil". *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **104** :661-676 ; c) Morelló, J. R.; Vuorela, S.; Romero, M. P.; Motilva, M. J.; Heinonen, M. (2005) "Antioxidant activity of olive pulp and olive oil phenolic compounds of the arbequina cultivar". *J. Agric. Food Chem.* **53**:2002-2008; d) Mateos, R.; Trujillo, M.; Pérez-Camino, M. C.; Moreda, W.; Cert, A. (2005) "Relationships between oxidative stability triacylglycerol composition and antioxidant content in olive oil matrices". *J. Agric. Food Chem.* **53**:5766-5771.
- 140 Cappola, M. L. (2001) "A better dissolution method for ranitidine tablets USP". *Pharm. Dev. Technol.* **6**, 11-17.
- 141 Ferraro, M. C. F.; Castellano, P. M.; Kaufman, T. S. (2001) "A spectrophotometric-partial least squares (PLS-1) method for the simultaneous determination of furosemide and amiloride hydrochloride in pharmaceutical formulations". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **26**:443-451.

- 142 Bendini, A.; Cerretani, L.; Vecchi, S.; Carrasco-Pancorbo, A. Lercker, G. (2006) "Protective effects of extra virgin olive oil phenolics on oxidative stability in the presence or absence of copper ions". *J. Agric. Food Chem.* **54**:4880-4887.
- 143 Christie, W. W. (1998). *Gas Chromatography and Lipids*. The Oily Press, Ayr, Escocia, p. 64.
- 144 Bhatia, M. S.; Kashedikar, S. G.; Chaturvedi, S. C. (1996) "Three simple spectrophotometric methods for simultaneous estimation of diclofenac sodium and paracetamol from tablets". *Indian Drugs* **33**:213-218.
- 145 Shinde, V. M.; Tendolkar, N. M.; Desai, B. S. (1994) "Simultaneous determination of paracetamol and diclofenac sodium in pharmaceutical preparations by quantitative TLC". *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC* **7**:50-53.
- 146 a) Nayak, V. G.; Bhate, V. R.; Purandare, S. M.; Dikshit, P.M.; Dhumal, S. N.; Gaitonda, C. D. (1992) "Rapid liquid-chromatographic determination of paracetamol and diclofenac sodium from a combined pharmaceutical dosage". *Drug Dev. Ind. Pharm.* **18**:369-374; b) Dimitrova, B.; Doytchinova, I.; Zlatkova, M. (2000) "Reversed-phase high-performance liquid chromatography for evaluating the distribution of pharmaceutical substances in suppository base-phosphate buffer system". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **23**:955-964; c) Nielsen Kudsk, F. (1980) "The HPLC determination of some anti-inflammatory, weak analgesic and uricosuric drugs in human blood plasma and its application to pharmacokinetics". *Acta Pharmacol. Toxicol.* **47**:267-273.
- 147 Sane, R. T.; Surve, S. R.; Gangrade, M. G.; Bapat, V. V.; Chonkar, N. L. (1993) "Simultaneous gas-chromatographic estimation of combined dosages. I. Amitriptyline hydrochloride with chlordiazepoxide. II. Methocarbamol with ibuprofen. III. Paracetamol with diclofenac sodium. IV. Paracetamol with promethazine hydrochloride". *Indian Drugs* **30**:66-72.
- 148 Patil, S. T.; Sundaresan, M.; Bhoir, I. C.; Bhagwat, A. M. (1998) "Packed column supercritical fluid chromatographic separation and estimation of acetaminophen, diclofenac sodium and methocarbamol in pharmaceutical dosage forms". *Talanta* **47**:3-10.

- 149 Zou, D.; Wu, X. J.; Nan, G. Z. (1997) "Analysis of compound common cold preparations with micellar electrokinetic capillary chromatography". *Yaowu Fenxi Zazhi* **17**:160-163.
- 150 Fernández de Córdova, M. L.; Ortega Barrales, P.; Molina Díaz, A. (1998) "Sensitive and selective determination of diclofenac sodium in pharmaceutical preparations by solid phase ultraviolet absorptiometry". *Anal Chim. Acta* **369**:263-268.
- 151 Balamurugan, C.; Aravindan, C.; Kannan, K.; Sathyanarayana, D.; Valliapan, K.; Manavalan, R. (2003) "Artificial neural network for the simultaneous estimation of multicomponent sampled by UV spectrophotometry". *Ind. J. Pharm. Sci.* **65**:274-278.
- 152 Mansfield, L.E. (2006) "Once-daily immediate-release fexofenadine and sustained-release pseudoephedrine combination: A new treatment option for allergic rhinitis". *Expert Opin. Pharmacother.* **7**:941-951.
- 153 Dash, A. K. (1994) "Determination of pseudoephedrine hydrochloride in dosage forms by liquid chromatography". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **12**:1601-1606.
- 154 Breier, A. R.; Steppe, M.; Schapoval, E. E. S. (2007) "Validation of UV spectrophotometric method for fexofenadine hydrochloride in pharmaceutical formulations and comparison with HPLC". *Anal. Lett.* **40**:2329-2337.
- 155 Gazy, A. A.; Mahgoub, H.; El-Yazbi, F. A.; El-Sayed, M. A.; Youssef, R. M. (2002) "Determination of some histamine H1-receptor antagonists in dosage forms". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30**:859-867.
- 156 a) Mikus, P.; Valásková, I.; Havránek, E. (2005) "Determination of fexofenadine in tablets by capillary electrophoresis in free solution and in solution with cyclodextrins as analyte carriers". *Drug Dev. Ind. Pharm.* **31**:795-801; b) Breier, A. R.; García, S. S.; Jablonski, A.; Steppe, M.; Shapoval, E. E. S. (2005) "Capillary electrophoresis method for fexofenadine hydrochloride in capsules". *J. AOAC Int.* **88**:1059-1063.
- 157 Golcu, A.; Dogan, B.; Ozkan, S. A. (2005) "Anodic voltammetric behavior and determination of antihistaminic agent: Fexofenadine HCl". *Anal. Lett.* **38**:1913-1931.

- 158 a) Breier, A. R.; Menegola, J.; Paim, C. S.; Steppe, M.; Schapoval, E. E. S. (2004) "Development and validation of a liquid chromatographic method for fexofenadine hydrochloride in capsules". *J. AOAC Int.* **87**:1093-1097; b) Radhakrishna, T.; Reddy, G. O. (2002) "Simultaneous determination of fexofenadine and its related compounds by HPLC". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24**:755-767.
- 159 Miura, M.; Uno, T.; Tateishi, T.; Suzuki, T. (2007) "Determination of fexofenadine enantiomers in human plasma with high-performance liquid chromatography". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43**:741-745.
- 160 a) Hofmann, U.; Seiler, M.; Drescher, S.; Fromm, M. F. (2002) "Determination of fexofenadine in human plasma and urine by liquid chromatography-mass spectrometry". *J. Chromatogr. B* **766**:227-233; b) Gergov, M.; Robson, J. N.; Ojanperä, I.; Heinonen, O. P.; Vuori, E. (2001) "Simultaneous screening and quantitation of 18 antihistamine drugs in blood by liquid chromatography ionspray tandem mass spectrometry". *Forensic Sci. Int.* **121**:108-115; c) Fu, I.; Woolf, E. J.; Matuszewski, B. K. (2004) "Determination of fexofenadine in human plasma using 96-well solid phase extraction and HPLC with tandem mass spectrometric detection". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **35**:837-846.
- 161 Uno, T.; Yasui-Furukori, N.; Takahata, T.; Sugawara, K.; Tateishi, T. (2004) "Liquid chromatographic determination of fexofenadine in human plasma with fluorescence detection". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **35**:937-942.
- 162 Zarapkar, S. S.; Bhandari, N. P.; Halkar, U. P. (2000) "Simultaneous determination of Fexofenadine Hydrochloride and Pseudoephedrine Sulfate in pharmaceutical dosage by reverse phase high performance liquid chromatography". *Indian Drugs* **37**:421-425.
- 163 Nirogi, R. V. S.; Kandikere, V. N.; Shukla, M.; Mudigonda, K.; Maurya, S.; Komarneni, P. (2006) "Simultaneous quantification of fexofenadine and pseudoephedrine in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with electrospray ionization: Method development, validation and application to a clinical study". *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**:3030-3038.

- 164 Walker, T. A.; Schmitt, G. L. (2006) "Separation of fexofenadine, pseudoephedrine, potential impurities, and degradation products using ion interaction chromatography". *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* **29**:25-43.
- 165 a) Berger, T. A.; Smith, J.; Fogelman, K.; Kruluts, K. (2002) "Semipreparative chiral separations using supercritical fluid chromatography with stacked injections". *Am. Lab. News* **32**:14-20; b) Radhakrishna, T.; Om Reddy, G. (2002) "Simultaneous determination of fexofenadine and its related compounds by HPLC". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **29**:681-690; c) Erk, N. (2001) "Analysis of binary mixtures of losartan potassium and hydrochlorothiazide by using high performance liquid chromatography, ratio derivative spectrophotometric and compensation technique". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24**:603-611.
- 166 Hunter, J. S. (1981) "Statistical methods". *J. Assoc. Anal. Chem.* **64**:574-583.
- 167 Mulvihill-Wilson, J.; Gaffney, F. A.; Neal, A. W.; Graham, R. M.; Pettinger, W. A.; Blomqvist, C. G. (1985) "Single and combined therapy for systemic hypertension with propranolol, hydralazine and hydrochlorothiazide: Hemodynamic and neuroendocrine mechanisms of action". *Am. J. Cardiol.* **56**:315-320.
- 168 Shinde, V.; Desai, B.; Tendolkar, N. (1994) "Simultaneous determination of propranolol hydrochloride and hydrochlorothiazide in tablets by quantitative TLC". *Indian Drugs* **31**:192-196.
- 169 Erram, S.; Tipnis, H. (1994) "Simple spectrometric analysis of propranolol hydrochloride and hydrochlorothiazide from combined pharmaceutical dosages". *Indian Drugs* **31**:65.
- 170 Prasad, C. V. N.; Bharadwaj, V.; Narsimhan, V.; Chowdhary, R. T.; Parimoo, P. (1997) "Simultaneous determination of metoprolol-hydrochlorothiazide and propranolol-hydrochlorothiazide in combined formulations by derivative spectroscopy". *J. AOAC Int.* **80**:325-330.
- 171 a) Hitscherich, M. E.; Rydberg, E. M.; Tsilifonis, D. C.; Daly, E. (1987) "Simultaneous determinations of hydrochlorothiazide and propranolol hydrochloride in tablets by high performance liquid chromatography". *J. Liq. Chromatogr.* **10**:1011-1021; b) Das Gupta,

- V.; Dhruv, A. (1986) "Quantitation of hydrochlorothiazide in combination with methyl dopa and propranolol hydrochloride by high-performance liquid chromatography". *Drug Dev. Ind. Pharm.* **12**:691-700.
- 172 a) Salem, M. Y.; El-Zanfaly, E. S.; El-Tarras, M. F.; El-Bardicy, M. G. (2003) "Simultaneous determination of domperidone and cinnarizine in a binary mixture using derivative spectrophotometry, partial least squares and principle component regression calibration". *Anal. Bioanal. Chem.* **375**:211-216; b) Durán Merás, I.; Espinosa Mansilla, A.; Salinas López, F.; Rodríguez Gómez, M. J. (2002) "Comparison of UV derivative-spectrophotometry and partial least-squares (PLS-1) calibration for determination of methotrexate and leucovorin in biological fluids". *Anal. Bioanal. Chem.* **373**:251-258.
- 173 a) Salinas, F.; Berzas Nevado, J. J.; Espinosa Mansilla, A. (1990) "A new spectrophotometric method for quantitative multicomponent analysis resolution of mixtures of salicylic and salicylic acids". *Talanta* **37**:347-351; b) Morelli, B. (1994) "Simultaneous determination of ceftriaxone and spectromycin in mixture by 'ratio-spectra' 2nd derivative and 'zero-crossing' 3rd derivative spectrophotometry". *Talanta* **41**:673-683; c) Youssef, N. F. (2005) "Stability-indicating methods for the determination of pirtanide in presence of the alkaline induced degradates". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **39**:871-887.
- 174 a) Xu, L.; Schechter, I. (1996) "Wavelength selection for simultaneous spectroscopic analysis. Experimental and theoretical study". *Anal. Chem.* **68**:2392-2400; b) Kasemsumran, S.; Du, Y. P.; Murayama, K.; Huehne, M.; Ozaki, Y. (2004) "Near-infrared spectroscopic determination of human serum albumin, γ -globulin, and glucose in a control serum solution with searching combination moving window partial least squares". *Anal. Chim. Acta* **512**:223-230; c) Jiang, J. H.; Berry, R. J.; Siesler, H. W.; Ozaki, Y. (2002) "Wavelength interval selection in multicomponent spectral analysis by moving window partial least-squares regression with applications to mid-infrared and near-infrared spectroscopic data". *Anal. Chem.* **74**:3555-3565.
- 175 Goicoechea, H. C. (2000) "Nuevas estrategias espectroscópicas para el análisis de fármacos en formas farmacéuticas y fluidos biológicos". Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Rosario.

- 176 Karpinska, J.; Mikoluc, B.; Piotrowska-Jastrzebska, J. (1998) "Application of derivative spectrophotometry for determination of coenzyme Q₁₀ in pharmaceuticals and plasma". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**:1345-1350.
- 177 Council of Europe (1995). *The European Pharmacopoeia*, 2^o Ed. Maisonneuve, Sainte-Ruffine, Francia.
- 178 Shah, S. A.; Rathod, I. S.; Suhagia, B. N.; Savale, S. S.; Patel, J. B. (2001) "Simultaneous determination of losartan and hydrochlorothiazide in combined dosage forms by first-derivative spectroscopy and high-performance thin-layer chromatography". *J. AOAC Int.* **84**:1715-1723.
- 179 Patil, K.; Bhanu, R.; Bhoir, S. I.; Sundaresan, M. (2003) "Isocratic separation and estimation of losartan potassium and hydrochlorothiazide by packed column supercritical fluid chromatography". *Indian Drugs* **40**:372-374.
- 180 Quaglia, M. G.; Donati, E.; Carlucci, G.; Mazzeo, P.; Fanali, S. (2002) "Determination of losartan and hydrochlorothiazide in tablets by CE and CEC". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **29**:981-987.
- 181 Hillaert, S.; Van den Bossche, W. (2003) "Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and several angiotensin-II-receptor antagonists by capillary electrophoresis". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **31**:329-339.
- 182 a) Carlucci, G.; Palumbo, G.; Mazzeo, P.; Quaglia, M. G. (2000) "Simultaneous determination of losartan and hydrochlorothiazide in tablets by high-performance liquid chromatography". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **23**:185-189; b) Hertzog, D. L.; McCafferty, J.; Fang, X.; Tyrrell, R. J.; Reed, R. A. (2002) "Development and validation of a stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of losartan potassium, hydrochlorothiazide, and their degradation products". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30**:747-760; c) Argekar, A. P.; Sawant, J. G. (2000) "A gradient reversed phase high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of hydrochlorothiazide (HCT) and losartan potassium (LOS) from tablets". *Anal. Lett.* **33**:869-880; d) Kanumula, G. V.; Raman, B. (2000) "Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and losartan potassium in pharmaceutical dosage by reverse phase high performance liquid chromatography". *Indian Drugs* **37**:38-41; e) Baing, M. M.;

- Vaidya, V. V.; Sane, R. T.; Menon, S. N.; Dalvi, K. (2006) "Simultaneous RP-LC determination of losartan potassium, ramipril, and hydrochlorothiazide in pharmaceutical preparations". *Chromatographia* **64**:293-296; f) Özkan, S. A. (2001) "Simultaneous determination of losartan potassium and hydrochlorothiazide from tablets and human serum by RP-HPLC". *J. Liquid Chromatogr. Relat. Technol.* **24**:2337-2346.
- 183 a) Kolocouri, F.; Dotsikas, Y.; Apostolou, C.; Kousoulos, C.; Loukas, Y. L. (2007) "Simultaneous determination of losartan, EXP-3174 and hydrochlorothiazide in plasma via fully automated 96-well-format-based solid-phase extraction and liquid chromatography-negative electrospray tandem mass spectrometry". *Anal. Bioanal. Chem.* **387**:593-601; b) Yang, P.; Li, L.; Sun, J.; He, Z.-G. (2006) "Bioequivalent evaluation of two brands of losartan/hydrochlorothiazide compound tablets in healthy Chinese male volunteers". *J. Chin. Pharm. Sci.* **15**:162-167; c) Koytchev, R.; Ozalp, Y.; Erenmemisoglu, A.; van der Meer, M. J.; Alpan, R. S. (2004) "Combination of losartan and hydrochlorothiazide: In vivo bioequivalence". *Arzneimittelforschung* **54**:611-617.
- 184 Gandhimathi, M.; Vikram, K.; Baskaran, A.; Ravi, T. K. (2001) "Simultaneous estimation of losartan potassium and hydrochlorothiazide in combination". *Indian J. Pharm. Sci.* **63**:165-166.
- 185 Shankar, M. B.; Metha, F. A.; Bhatt, K. K.; Metha, R. S.; Geetha, M. (2003) "Simultaneous spectrophotometric determination of tizanidine and diclofenac in tablets". *Indian J. Pharm. Sci.* **65**:167-170.
- 186 Lande, N. R.; Shetkar, B. M.; Kadam, S. S.; Dhaneshwar, S. R. (2001) "Simultaneous spectrophotometric estimation of losartan potassium and hydrochlorothiazide from combined dosage form". *Ind. J. Pharm. Sci.* **56**:66-69
- 187 Vetuschi, C.; Giannandrea, A. (2003) "Anti-beer evaluation of hydrochlorothiazide and losartan by UV derivative spectrophotometry". *Anal. Lett.* **36**:1051-1064.
- 188 Dinc, E.; Üstündag, O. (2005) "Application of multivariate calibration techniques to HPLC data for quantitative analysis of a binary mixture of hydrochlorothiazide and losartan in tablets". *Chromatographia* **61**:237-244.

- 189 Sathyanarayana, D.; Kannan, K.; Manavalan, R. (2004) "Back-propagation neural network model for simultaneous spectrophotometric estimation of losartan potassium and hydrochlorothiazide in tablet dosage". *Ind. J. Pharm. Sci.* **66**:745-752.
- 190 a) Goicoechea, H. C.; Olivieri, A. C. (1998) "Simultaneous determination of phenobarbital and phenytoin in tablet preparations by multivariate spectrophotometric calibration". *Talanta* **47**:103-108; b) Garrido Frenich, A.; Jouan-Rimbaud, D.; Massart, D. L.; Kuttatharmmakul, S.; Martínez Galera, M.; Martínez Vidal, J. M. (1995) "Wavelength selection method for multicomponent spectrophotometric determination using partial least squares". *Analyst* **120**:2787-2792.
- 191 Cullen, T. F.; Crouch, S. R. (2000) "Factors affecting the accuracy of multicomponent kinetic-spectrophotometric determinations based on multivariate calibration methods". *Anal. Chim. Acta* **407**:135-146.
- 192 a) Frits, A. P.; Mavris, D. N. (2002). *9th AIAA/ISSMO Symposium on Multidisciplinary Analysis and Optimization*, Atlanta, EEUU; b) Lewis, G. A.; Mathieu, D.; Phan-Tan-Luu, R. (1999). *Pharmaceutical Experimental Design*. Marcel Dekker, Nueva York, EEUU, Cap. 10.
- 193 a) Mandel, J.; Linnig, F. J. (1957) "Study of accuracy in chemical analysis using linear calibration curves". *Anal. Chem.* **29**:743-749; b) González, A. G.; Herrador, M. A.; Asuero, A. G. (1999) "Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays". *Talanta* **48**:729-736.
- 194 Vera-Candioti, L.; Robles, J.; Mantovani, V.; Goicoechea, H. (2006) "Multiple response optimization applied to the development of a capillary electrophoretic method for pharmaceutical analysis". *Talanta* **69**:140-147.
- 195 Suhagia, B. N.; Shah, R. R.; Patel, S. M. (2005) "Development of a RP-HPLC method for evaluating losartan potassium and hydrochlorthiazide tablets". *Ind. J. Pharm. Sci.* **67**:37-42.
- 196 Lusina, M.; Cindric, T.; Tomaic, J.; Pekoia, M.; Pozaic, L.; Musulin, N. (2005) "Stability study of losartan/hydrochlorothiazide tablets". *Int. J. Pharm.* **291**:127-137

- 197 Naylor, L. J.; Bakatselou, V.; Dressman, J. B. (1993) "Comparison of the mechanism of dissolution of hydrocortisone in simple and mixed micelle systems". *Pharm. Res.* **10**:865-870.
- 198 a) Williams, R. L.; Upton, R. A.; Ball, L.; Braun, R. L.; Lin, E. T.; Liang-Gee, W.; Leeson, L. J. (1991) "Development of new control release formulation of chlorpheniramine maleate using in-vitro, in-vivo correlation". *J. Pharm. Sci.* **80**:22-25; b) Fassihi, R. A.; Ritschel, W. A. (1993) "Multiple layer, direct compression controlled release system: In vitro and in vivo evaluation". *J. Pharm. Sci.* **82**:750-754; c) Munday, D. L.; Fassihi, R. A. (1995) "In vitro-in vivo correlation studies on a novel controlled release theophylline delivery system and on Theo-Dur tablets". *Int. J. Pharm.* **118**:251-255; d) Grundy, J. S.; Anderson, K. E.; Rogers, J. A.; Foster, R. T. (1997) "Studies on dissolution testing of the nifedipine gastrointestinal therapeutic system. II. Improved in vivo/in vitro correlation using a two-phase dissolution test". *J. Controll. Release* **48**:9-17.
- 199 Food and Drug Administration (1995). *FDA Guidance for Industry, Immediate Release Solid Dosage Forms: Scale-up and Post Approval Changes (SUPAC-IR). Chemistry, Manufacturing and Controls, In Vitro Dissolution Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation*. FDA, Rockville, EEUU.
- 200 Adams, E.; De Maesschalck, R.; De Spiegeleer, B.; Vander Heyden, Y.; Smeyers-Verbeke, J.; Massart, D. L. (2001) "Evaluation of dissolution profiles using principal component analysis". *Int. J. Pharm.* **212**:41-53.
- 201 Manly, B. F. J. (1986). *Multivariate Statistical Methods: A Primer*. Chapman & Hall, Nueva York, EEUU.
- 202 Tsong, Y.; Hammerstrom, T. (1994) "Statistical issues in drug quality control based on dissolution testing". *Proceedings of the Biopharmaceutical Section, American Statistical Association*, pp. 295-300.
- 203 Shah, V. P.; Tsong, Y.; Sathe, P.; Liu, J.-P. (1998) "In vitro dissolution profile comparison—statistics and analysis of the similarity factor, f_2 ". *Pharm. Res.* **15**:889-896.

- 204 Ma, M.-C.; Wang, B. B. C.; Liu, J.-P.; Tsong, Y. (2000) "Assessment of similarity between dissolution profiles". *J. Biopharm. Stat.* **10**:229-249.
- 205 Tsong, Y.; Hammerstrom, T.; Chen, J. J. (1997) "Multipoint dissolution specification and acceptance sampling rule based on profile modeling and principal component analysis". *J. Biopharm. Stat.* **7**:423-439.
- 206 a) Efron, B.; Tibshirani, R. J. (1986) "Bootstrap methods for standard errors, confidence intervals and other measures of statistical accuracy". *Stat. Sci.* **1**:54-77; b) Efron, B.; Tibshirani, R. J. (1993). *An Introduction to the Bootstrap*. Chapman & Hall, Nueva York, EEUU.
- 207 Eaton, M. L.; Muirhead, R. J.; Steeno, G. S. (2003). *Biopharmaceutical Report, Winter*. Biopharmaceutical Section, American Statistical Association **11**:2.
- 208 a) Tsong, Y.; Hammerstrom, T.; Sathe, P.; Shah, V. P. (1996) "Statistical assessment of mean differences between two dissolution data sets". *Drug Inf. J.* **30**:1105-1112; b) Ma, M. C.; Lin, R. P.; Liu, J. P. (1999) "Statistical evaluation of dissolution similarity". *Stat. Sin.* **9**:1011-1028; c) Chow, S. C.; Shao, J. (2002) "On the assessment of similarity for dissolution profiles of two drug products". *J. Biopharm. Stat.* **12**:311-321.
- 209 Liu, J. P.; Ma, M. C.; Chow, S. C. (1997) "Multiple-time-point dissolution specifications for a sampling acceptance plan". *Drug Inf. J.* **31**:1255-1271.
- 210 Tsong, Y.; Hammerstrom, T.; Lin, K.; On, T. E. (1995) "Dissolution test acceptance sampling plans". *J. Biopharm. Stat.* **5**:171-183.
- 211 Chen, J. J.; Tsong, Y. (1997) "Multiple-time-point dissolution specifications for a sampling acceptance plan". *J. Biopharm. Stat.* **7**:259-262.
- 212 Saranadasa, H.; Krishnamoorthy, K. (2005) "A multivariate test for similarity of two dissolution profiles". *J. Biopharm. Stat.* **15**:265-278.
- 213 De Villiers, M. M.; Van der Watt, J. G.; Lotter, A. P. (1992) "Kinetic study of the solid-state photolytic degradation of two polymorphic forms of furosemide". *Int. J. Pharm.* **88**:197-203.

- 214 a) Doff, D. H.; Brownen, F. L.; Corrigan, O. I. (1986) "Determination of alpha impurities in the beta polymorph of inosine using infra-red spectroscopy and x-ray powder diffraction". *Analyst* **111**:179-182; b) Burger, A.; Dialer, R. D. (1983) "Neue untersuchungsergebnisse zur polymorphie von sulfathiazol". *Pharm. Acta Helv.* **58**:72-78; c) Fletton, R. A.; Lancaster, R. W.; Harris, R. H.; Kenwright, A. M.; Parker, K. J.; Waters, D. N.; Yeadon, A. (1986) "A comparative spectroscopic investigation of two polymorphs of 4'-methyl-2'-nitroacetanilide using solid-state infrared and high-resolution solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy". *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1705-1710; d) Jalsovszky, G.; Egyed, O.; Holly, S.; Hegedus, B. (1995) "Investigation of the morphological composition of cimetidine by FT-Raman spectroscopy". *Appl. Spectrosc.* **49**:1142-1145; e) Yu, L. X.; Scott Furness, M.; Raw, A.; Woodland Outlaw, K. P.; Nashed, N. E.; Ramos, E.; Miller, S. P. F.; Adams, R. C.; Fang, F.; Patel, R. M.; Holcombe, F. O.; Chiu, Y.; Hussain, A. S. (2003) "Scientific considerations of pharmaceutical solid polymorphism in abbreviated new drug applications". *Pharm. Res.* **20**:531-535; f) Gu, X. J.; Jiang, W. (1996) "Near infrared spectroscopy: The future waves". Davies, A. M. C.; Williams P. (Eds.). NIR Publications, Chichester, Inglaterra; g) Giron-Forest, D.; Goldbronn, Ch.; Piechon, P. (1989) "Thermal analysis methods for pharmacopoeial materials". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **7**:1421-1433; h) Kuhnert-Brandstätter, M.; Riedmann, M. (1989) "Thermal analytical and infrared spectroscopic investigations on polymorphic organic compounds - IV". *Mikrochim. Acta* **2**:173-184; i) Kuhnert-Brandstätter, M.; Riedmann, M. (1989) "Thermal analytical. and infrared spectroscopic investigations on polymorphic. organic compounds - I". *Mikrochim. Acta* **2**:107-120; j) Burger, A. (1982) "Thermodynamics and other aspects of the polymorphism of drugs". *Pharm. Int.* **3**:158-163; j) Grunenberg, A.; Keil, B.; Henck, J. O. (1995) "Polymorphism in binary mixtures, as exemplified by nimodipine". *Int. J. Pharm.* **118**:11-21; k) Gerber, J. J.; Caira, M. R.; Lötter, A. P. (1993) "Structures of two conformational polymorphs of the cholesterol-lowering drug probucol". *J. Crystal. Spect. Res.* **23**:863 -866.
- 215 Al-Alawi, A.; van de Voort F. R.; Sedman J. (2004) "New FTIR method for the determination of free fatty acids in oils". *J. Am. Oil Chem. Soc.* **81**:441-446.
- 216 Li, H.; van de Voort, F. R.; Ismail A. A.; Cox, R. (2000) "Trans determination of edible oils by Fourier transform near-infrared spectroscopy". *J. Am. Oil Chem. Soc.* **77**:1061-1067.

- 217 Li, H.; van de Voort, F. R.; Ismail, A. A.; Sedman, J.; Cox, R.; Simard, C.; Buijs, H. (2000) "Discrimination of edible oil products and quantitative determination of their iodine value by Fourier transform near-infrared spectroscopy". *J. Am. Oil Chem. Soc.* **77**:29-36.
- 218 Yang H.; Irudayaraj, J. (2001) "Characterization of edible coatings and microorganisms on produce surface using depth profile analysis". *J. Am. Oil Chem. Soc.* **78**:889-895.
- 219 Marigheto, N. A.; Kemsley, E. K.; Defernez, M. Wilson, R. H. (1998) "A comparison of mid-infrared and Raman spectroscopies for the authentication of edible oils". *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75**:987-992.
- 220 Iñón, F. A.; Garrigues, J. M.; Garrigues, S.; Molina A.; de la Guardia M. (2003) "Selection of calibration set samples in determination of olive oil acidity by partial least squares-attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy". *Anal. Chim. Acta* **59**:49-75.
- 221 Bramley, P. M.; Elmadfa, I.; Kafatos, A.; Kelly, F. J.; Manios, Y.; Roxborough, H. E.; Schuch, W.; Sheehy, P. J. A.; Wagner, K. H. (2000) "Vitamin E". *J. Sci. Food Agric.* **80**:913-938.
- 222 Kochar, S. P.; Rossell, J. B. en Hudson, B. J. F. (Eds.). (1990). *Food Antioxidants*. Elsevier, Londres, Inglaterra, pp. 19-64.
- 223 Whittle, K. J.; Pennock, J. F. (1967) "The examination of tocopherols by two-dimensional thin-layer chromatography and subsequent colorimetric determination". *Analyst* **92**:423-430.
- 224 Abidi, S. L. (2000) "Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants". *J. Chromatogr. A* **881**:197-216.
- 225 Galeano Díaz, T.; Durán Merás, I.; Guiberteau Cabanillas, A.; Alexandre Franco, M. F. (2004) "Voltammetric behavior and determination of tocopherols with partial least squares calibration: Analysis in vegetable oil simples". *Anal. Chim. Acta* **511**:231-238.
- 226 Visioli, F.; Galli, C. (2002) "Biological properties of olive oil phytochemicals". *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **42**:209-221; b) Manna, C.; Galletti, P.; Cucciola, V.; Montedoro,

- G.; Zappia, V. (1999) "Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages". *J. Nutr. Biochem.* **10**:159-165; c) Gordon, M. H.; Paiva-Martín, F.; Almeida, M. (2001) "Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols". *J. Agric. Food Chem.* **49**:2480-2485.
- 227 Bendini, A.; Bonoli, M.; Cerretani, L.; Biguzzi, B.; Lercker, G.; Gallina Toschi, T. (2003) "Liquid-liquid and solid-phase extractions of phenols from virgin olive oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods". *J. Chromatogr. A.* **985**:425-433.
- 228 Pirisi, F. M.; Cabras, P.; Falqui Cao, C.; Migliorini, M.; Muggelli, M. (2000) "Phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Reappraisal of the extraction, HPLC separation, and quantification procedures". *J. Agric. Food Chem.* **48**:1191-1196.
- 229 a) Rodríguez, G.; Jiménez, A.; Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez, R.; Guillén, R. (2006) "Obtención de compuestos orgánicos de interés a partir de los residuos de la extracción del aceite de oliva". *Grasas y Aceites* **57**:95-106; b) Caruso, D.; Colombo, R.; Patelli, R.; Giavarini, F.; Galli, G. (2000) "Rapid evaluation of phenolic component profile and analysis of oleuropein aglycon in olive oil by atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (APCI-MS)". *J. Agric. Food Chem.* **48**:1182-1185; c) Montedoro, G.; Servili, M.; Baldioli, R.; Miniati, E. (1992) "Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC". *J. Agric. Food Chem.* **40**:1571-1576; d) Montedoro, G.; Servili, M.; Baldioli, R.; Miniati, E. (1992) "Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Initial characterization of the hydrolyzable fraction". *J. Agric. Food Chem.* **40**:1577-1580; e) Montedoro, G.; Servili, M.; Baldioli, M.; Selvaggini, R.; Miniati, E.; Macchioni, A. (1993) "Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterization of the secoiridoid derivatives". *J. Agric. Food Chem.* **41**:2228-2234; f) Angerosa, F.; D'Alessandro, N.; Corana, F.; Mellerio, G. (1996) "Characterization of phenolic and secoiridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry". *J. Chromatogr. A* **753**:195-203; g) Pirisi, F. M.; Angioni, A.; Cabras, P.; Garau, V. L.; Sanjust de Teulada, M. T.; Dos Santos, M. K.; Bandiono, G. (1997) "Phenolic compounds in virgin olive oils. I. Low-wavelength quantitative determination of complex phenols by high-performance liquid chromatography under isocratic

- elution". *J. Chromatogr. A* **768**:207-213; h) Mateos, R.; Espartero, J. L.; Trujillo, M.; Ríos, J. J.; Leon-Camacho, M.; Alcudia, F.; Cert, A. (2001) "Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection". *J. Agric. Food Chem.* **49**:2185-2192.
- 230 a) Cifuentes, A.; Bartolomé, B.; Gómez-Corodovés, C. (2001) "Fast determination of procyanidins and other phenolic compounds in food samples by micellar electrokinetic chromatography using acidic buffers". *Electrophoresis* **22**:1561-1567; b) Boyce, M. C. (2001) "Determination of additives in food by capillary electrophoresis". *Electrophoresis* **22**:1447-1459; c) Issaq, H. J. (1999) "Capillary electrophoresis of natural products-II". *Electrophoresis* **20**:3190-3202; d) Frazier, R. A.; Ames, J. M.; Nursten, H. E. (1999) "The development and application of capillary electrophoresis methods for food analysis". *Electrophoresis* **20**:3156-3180.
- 231 Capannesi, C.; Palchetti, I.; Mascini, M.; Parenti, A. (2000) "Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils". *Food Chem.* **71**:553-562.