



CAPÍTULO 3

Resumen y Conclusiones

RESUMEN

Para la realización de la presente Tesis se trabajó en la resolución de diferentes problemas analíticos, para lo cual se desarrollaron métodos de análisis basados en la combinación de técnicas espectrofotométricas de absorción electrónica acopladas a herramientas quimiométricas.

Para la concreción de los citados desarrollos, se utilizaron métodos de calibración multivariada para modelar respuestas de primer orden, lineales y no lineales, basados fundamentalmente en los modelos PLS-1 y redes neuronales artificiales, y se manejaron aspectos relativos a la optimización experimental y a la validación de metodologías analíticas.

En primer lugar se realizó un estudio de los métodos de análisis multivariado, a los fines de establecer cuál era el más conveniente para la determinación de los analitos de interés en las muestras a ser analizadas. De esta manera se determinó que los métodos clásicos (OLS/CLS) no eran adecuados para resolver los problemas analíticos planteados, debido a su vulnerabilidad ante la presencia de colinealidades, originadas por el alto grado de solapamiento de los espectros de las sustancias involucradas. Por otra parte, se determinó además que no era posible utilizar este tipo de métodos en sistemas con alto número de componentes o en aquellos en que no se conocen todos los componentes presentes (suero sanguíneo). Se seleccionaron para trabajar los modelos lineales y no lineales de PLS y las redes neuronales artificiales, los que demostraron ser adecuados para realizar el análisis de muestras complejas, tales como el suero sanguíneo humano y las preparaciones farmacéuticas.

En todos los desarrollos analíticos realizados, como primer paso se analizó el comportamiento espectral de los analitos de interés y de las matrices de las muestras a ser analizadas, y la linealidad de la respuesta.

A los fines de optimizar los modelos de calibración, se trabajó con juegos de muestras de calibración preparadas de acuerdo a diseños experimentales, se analizaron los parámetros estadísticos indicadores de la calidad del ajuste y se implementaron estrategias de mejoramiento, tal como la selección de regiones.

Para validar los modelos óptimos establecidos para la calibración, se prepararon juegos de muestras artificiales, siguiendo un diseño estadístico, se analizaron los resultados obtenidos mediante la aplicación de una prueba estadística como la región elíptica de confianza conjunta para la pendiente y la ordenada al origen y se evaluó la capacidad predictiva de los modelos utilizados.

A los fines de evaluar los errores y determinar parámetros indicadores de la calidad del funcionamiento de los métodos desarrollados, tales como exactitud y precisión, se prepararon muestras artificiales, se trabajó sobre muestras comerciales, se realizaron ensayos de recuperación y se compararon resultados con los obtenidos mediante la aplicación de métodos oficiales.

Los problemas analíticos estudiados fueron:

1- Determinación de dexametasona fosfato de sodio en inyectables.

Las muestras comerciales del inyectable que se analizaron, tenían un contenido declarado de dexametasona fosfato de sodio de 4 mg ml^{-1} juntamente con los siguientes excipientes: $800.00 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ de creatinina, $300.00 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ de propilparabeno, 2.02 mg ml^{-1} de sulfito ácido de sodio, 1.13 mg ml^{-1} de citrato de sodio y 1.60 mg ml^{-1} de hidróxido de sodio.

En este tipo de muestra la determinación de dexametasona fosfato por espectroscopia convencional sin la aplicación de un procedimiento previo de separación no es posible, debido al solapamiento presentado entre la dexametasona fosfato y los excipientes del inyectable en el espectro UV. Esto se solucionó siguiendo dos alternativas diferentes: a) adaptando un método espectrofotométrico colorimétrico para la determinación de fósforo y b) utilizando calibración multivariada.

Para la alternativa a) se optimizó un método colorimétrico basado en la reacción entre el grupo fosfato (obtenido por calcinación) y dos reactivos: molibdato de sodio y ácido ascórbico para dar azul de molibdeno. Este método analítico se adaptó para el análisis del inyectable y luego se optimizó y se validó su funcionamiento. Para la optimización se eligió como función objetivo una cifra de mérito: la precisión, y se trabajó para minimizar el coeficiente de variación (CV%) del método analítico. Los factores estudiados fueron: tiempo de calcinación, volumen de solución de cloruro de magnesio agregada, uso o no de material volumétrico para obtener el volumen final de reacción, posición para el calentamiento durante la etapa de calcinación. Para determinar los factores que tenían un efecto significativo sobre la respuesta, se aplicó un diseño experimental de Plackett-Burman y mediante una prueba de ANOVA se vio que los factores que se debían optimizar eran: tiempo de calcinación y volumen de solución de cloruro de magnesio agregada. Para esto, se trabajó con un diseño factorial completo a tres niveles (3^2) y a partir de los datos obtenidos se obtuvo una superficie de respuesta, utilizando una función polinómica de segundo orden.

Se encontró que los valores óptimos de los factores, correspondientes a la mínima respuesta ($CV\%=0.077$) y consecuentemente a la máxima precisión eran: tiempo de calcinación, 2 min, y cantidad de solución de cloruro de magnesio, 0.080 ml.

Una vez determinados los valores óptimos de los factores con efecto significativo sobre la respuesta, se procedió a la validación del método analítico y se evaluaron los siguientes parámetros de funcionamiento: linealidad, precisión y exactitud. A partir del análisis de los mismos, se determinó que el funcionamiento del método era satisfactorio y se concluye que puede ser utilizado en el laboratorio para el control de calidad del inyectable estudiado.

Para la alternativa b), se desarrolló un método analítico basado en la combinación de una espectrofotometría UV y un método de calibración multivariada, para realizar la determinación simultánea de dexametasona fosfato de sodio y de dos excipientes: creatinina y propilparabeno, presentes en el inyectable. Como método de calibración multivariada se utilizó PLS-1.

Para la calibración, se preparó un juego de 15 muestras siguiendo un diseño central compuesto, de manera que la concentración de los componentes en las muestras abarque el intervalo: 80 a 120 % de las cantidades presentes en las muestras comerciales.

Para la validación se trabajó con dos juegos de muestras de validación, el juego nº 1 se usó para determinar exactitud y precisión intra e inter-ensayo y con el juego de validación nº 2 se construyó un gráfico de cantidad predicha versus cantidad adicionada, con el correspondiente intervalo de confianza conjunto para la pendiente y la ordenada al origen.

Se aplicó el método PLS-1, seleccionando el número óptimo de factores por aplicación del método de validación cruzada y la región espectral óptima de trabajo mediante la estrategia de ventana móvil. El modelo de calibración óptimo para PLS-1 encontrado, se aplicó para predecir las concentraciones de los componentes en las muestras reales y en las muestras sintéticas. Dado que la región elíptica de confianza conjunta (EJCR) para la pendiente y la ordenada al origen, contiene el valor (1,0) teóricamente esperado, se concluye que no hay evidencia de error sistemático en la determinación de la dexametasona, cuando se usa la metodología propuesta en la presente tesis.

2- Determinación simultánea de dipirona y dextropropoxifeno en inyectables.

Las muestras comerciales del inyectable que se analizaron, tenían un contenido declarado de 50 mg de dextropropoxifeno y 1500 mg de dipirona (por 5 ml) (Relación Dipirona/Dextropropoxifeno = 32:1).

En una muestra de este tipo, con proporciones de ambos componentes activos altamente diferentes, la determinación simultánea de los mismos mediante una medición espectrofotométrica, presentaba a priori el inconveniente de que el analito presente en mayor concentración originaría señales con desviaciones de la ley de Beer, mientras que el analito presente en menor concentración proporcionaría señales cercanas al nivel de ruido.

Para resolver este problema analítico, los datos de absorción electrónica obtenidos se trataron con los modelos lineales y no lineales de PLS y con redes neuronales artificiales.

Se trabajó con dos juegos de doce muestras de calibración cada uno (total = 24 muestras), preparadas de acuerdo a un diseño central compuesto y con dos juegos de muestras de validación de doce muestras cada uno (total = 24 muestras), preparadas siguiendo un diseño factorial completo.

En primer lugar, se analizaron los datos obtenidos con PLS-1. Se seleccionó el número óptimo de factores por aplicación del método de validación cruzada y la región espectral óptima de trabajo mediante la estrategia de ventana móvil. Los parámetros de calibración resultaron razonablemente buenos para ambos analitos, pero fue necesario trabajar con cuatro factores, dos más de lo esperado teóricamente (dos factores) y esto puede estar causado por las no linealidades, las que son tenidas en cuenta en el modelo por inclusión de factores adicionales. Luego, se aplicó esta calibración (óptima) para PLS-1, con el objeto de predecir las concentraciones de los componentes en las muestras reales y en las muestras sintéticas de validación y se observó que los errores en la predicción eran importantes.

Al construir una gráfica de concentraciones adicionadas vs. predichas y hacer un análisis de los residuos obtenidos, se pudo observar que las predicciones del modelo PLS lineal para dipirona presentan una fuerte desviación de la linealidad.

Por esta razón, los datos espectrales obtenidos se trataron a continuación, con los modelos no lineales de PLS: NL-PLS y SPL-PLS y con ANNs. Se trabajó con una ANN construida con un diseño de tres capas de neuronas o nodos, conectadas de manera jerárquica y el número de neuronas de la capa de entrada y de la capa escondida se optimizó durante el entrenamiento de la red. Para el entrenamiento de la ANN se utilizaron las 24 muestras de calibración, uno de los juegos de 12 muestras de validación se uso como muestras de monitoreo y el otro como muestras de validación. La arquitectura seleccionada finalmente para ambos componentes fue la siguiente: para dipirona se usaron tres neuronas de entrada, cuatro escondidas y una de salida, mientras que para dextropropoxifeno se usaron cinco neuronas de entrada, tres escondidas y una de salida. A los fines de encontrar el mejor modelo, cada una de las redes se entrenó con el juego de muestras de calibración, pero teniendo en

cuenta la evolución de los errores de calibración y de los de predicción en el juego de monitoreo, en función del número de iteraciones o ciclos.

Para el caso de la dipirona, los resultados obtenidos mejoran al aplicar los modelos no lineales de PLS, pero son mejores aún cuando se aplica ANNs. Al construir la gráfica de concentraciones predichas vs. concentraciones adicionadas utilizando el método de ANNs, puede observarse que la curvatura esta significativamente disminuida. Esto permite concluir que la no linealidad para dipirona es considerable, y que el análisis con ANNs es capaz de tener en cuenta esta no linealidad de manera más eficiente, en comparación con los modelos lineales y no lineales de PLS.

Para el dextropropoxifeno, el análisis de las muestras sintéticas y comerciales con los modelos no lineales de PLS, no mostró resultados tan buenos como para la dipirona. Esto podría deberse a que los errores causados por la baja relación señal/ruido en este tipo de muestras con baja concentración, son más importantes en presencia de no linealidades. Sí se observa un mejoramiento en la predicción cuando se aplica ANNs, lo que demuestra el poder de este método no sólo para modelar no linealidades, sino también en el mejoramiento de los resultados, en comparación con los modelos lineales.

3- Determinación de carbamazepina en suero humano.

El análisis de fármacos en sangre constituyó un gran desafío, debido a la gran cantidad de constituyentes presentes en la matriz sérica. Los métodos utilizados en la actualidad son separativos (como HPLC) o inmunológicos, que en el primer caso logran aislar el analito de interés y en el segundo cuentan con la altísima selectividad de las reacciones immunoquímicas. Para este desarrollo, se diseñó un procedimiento completamente asistido por herramientas quimiométricas, para la determinación de carbamazepina en muestras de suero obtenidas de pacientes tratados con el fármaco.

El método analítico desarrollado esta basado en una espectroscopia de absorción ultravioleta, posterior a una extracción con solvente orgánico, y aplicación del método PLS-1 a la segunda derivada de los datos espectrales obtenidos.

En primer lugar, se aplicó una metodología de superficie de respuesta basada en un diseño de mezclas, a los fines de seleccionar las mejores condiciones en el paso de extracción de la carbamazepina. Se trabajó con tres solventes diferentes: benceno, tolueno y 1-pentanol y se realizaron 15 experimentos para probar los tres solventes puros y combinaciones de dos o tres de ellos. Se evaluó la recuperación

obtenida y se determinó que el valor óptimo (máxima recuperación) se alcanzaba trabajando con benceno puro.

Para la calibración, se preparó un juego de nueve muestras siguiendo un diseño central compuesto, adicionando a una mezcla de sueros de personas sanas diferentes volúmenes de las soluciones *stock* de CBZ y de CBZ-EP. Para la validación, se prepararon tres juegos de muestras, que se utilizaron para evaluar la capacidad predictiva del modelo, la precisión del método desarrollado y para realizar estudios de recuperación, respectivamente.

Se aplicó el método PLS-1 a los datos espectrales de orden cero y a los obtenidos al aplicar la segunda derivada a los mismos y a los fines de trabajar con una cantidad de información óptima y evitar el sobreajuste, se seleccionó el número óptimo de factores utilizando el procedimiento de validación cruzada. Al utilizar el espectro derivado se ve incrementada la habilidad predictiva del modelo quimiométrico, siendo menores los errores estimados para la calibración y la predicción. Esto se debe a que al trabajar con la señal derivada, se eliminó un efecto de corrimiento de la línea de base, originado en la extracción.

A partir de los resultados del experimento de recuperación se determinó que no hay evidencia de error sistemático (región elíptica de confianza conjunta para la gráfica de concentraciones adicionadas vs. concentraciones predichas), y en la comparación con los métodos de referencia de HPLC y FPIA, se obtuvo una buena concordancia entre los resultados.

4- Determinación simultánea de permetrina e imidacloprid en pipetas pulguicidas.

Las muestras comerciales analizadas de las pipetas pulguicidas para uso veterinario, tenían un contenido de permetrina de 24.0 g %, imidacloprid de 6.0 g %, y como excipientes: aceite de almendra, propilencarbonato, alcohol bencílico y butilhidroxitolueno.

Para resolver el problema analítico de la determinación simultánea de los principios activos de este preparado farmacéutico, en la matriz compleja de los excipientes antes mencionados, se desarrolló un método de análisis basado en una técnica de espectroscopia ultravioleta combinada con el método PLS-1 de calibración multivariada.

Para la calibración se trabajó con un juego de 17 muestras preparadas de acuerdo a un diseño central compuesto, con cinco niveles de concentración diferentes para ambos principios activos y para los excipientes, comprendidos dentro del rango: 80 a 120 % de las concentraciones indicadas por el fabricante para las muestras comerciales.

Para la validación se preparó un juego de 11 muestras siguiendo un diseño central compuesto, con cinco niveles de concentración diferentes para ambos principios activos, comprendidos dentro del rango: 90 a 110 % de las concentraciones indicadas por el fabricante para las muestras comerciales. Los excipientes fueron agregados en un nivel de concentración del 100 %.

Los datos espectrales obtenidos se analizaron con el método PLS-1, seleccionando el número óptimo de factores mediante el procedimiento de validación cruzada. A los fines de mejorar los parámetros estadísticos de la calibración, se implementó una selección de regiones usando el método de ancho de ventana móvil para encontrar la región de mínimo PRESS. Se trabajó con dos anchos de ventana diferentes, se encontraron dos rangos de sensores para cada componente y se realizó la calibración, observándose una mejora en los parámetros.

Luego se realizó la predicción de la concentración de ambos componentes activos en las muestras de validación, trabajando con el rango completo de sensores y en ambas regiones seleccionadas y se observó que los resultados eran mejores cuando se utilizaba el rango completo. Esto demostró que al realizar la selección de regiones se logró mejorar los parámetros estadísticos de la calibración, pero no se obtuvo mejora en la predicción. Por esta razón se decidió trabajar con el rango completo de sensores.

Para evaluar el funcionamiento del método se construyó una gráfica de concentraciones adicionadas vs. concentraciones predichas, usando para el ajuste cuadrados mínimos ponderados, para ambos componentes y se comparó el valor de la pendiente y de la ordenada al origen, con sus valores ideales de 1 y 0, usando la prueba de la región elíptica de confianza conjunta (*EJCR*). Además se compararon los resultados obtenidos sobre muestras comerciales, con los del método cromatográfico.

CONCLUSIONES

El control de calidad de fármacos representa en la actualidad un tema de gran importancia en la comercialización de medicamentos. Tanto el control de los medicamentos para la venta, como el análisis en las etapas de investigación de nuevos fármacos, requieren de métodos analíticos rápidos y confiables que garanticen el cumplimiento de las normativas vigentes.

Por otra parte, el estado exige el control de calidad de materias primas, productos en proceso y productos terminados y para esto se pueden seguir las especificaciones que aparecen en las Farmacopeas.

La mayoría de los métodos recomendados en dichas Farmacopeas para el análisis de los principios activos en presencia de otros componentes se basan en la utilización de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Esta es una técnica muy exacta y precisa, pero requiere de costosos equipos y de un tiempo considerable para ponerlos a punto, además de utilizar algunas veces solventes contaminantes. Por otra parte, existe una gran cantidad de nuevos productos para los que no se halla disponible un método oficial para llevar a cabo su análisis. Por esta razón, en el presente trabajo se planteó la posibilidad de desarrollar métodos analíticos espectroscópicos de absorción electrónica acoplados a técnicas computacionales, que resulten rápidos, confiables, de bajo costo, no contaminantes y con la posibilidad de ser aplicados en laboratorios de mediana complejidad.

Otro aspecto importante que se planteó es la posibilidad de extender tales métodos al análisis de fármacos en sangre. La evaluación de los niveles séricos de los medicamentos resulta crítica en el cuidado de los pacientes, ya que pueden evitarse tanto las sobredosis como también dosis que no lleguen a ser efectivas. Existen fármacos que al ser suministrados en niveles elevados pueden causar serios problemas de salud e incluso la muerte, y otros, como los antibióticos, que requieren de un uso en cantidades no excesivas para no originar resistencia en los microorganismos que son tratados.

Los sistemas estudiados en el presente trabajo de Tesis, constituyeron verdaderos desafíos analíticos, debido al alto grado de solapamiento presentado por los espectros de sus componentes. Para la resolución de los diferentes problemas analíticos se emplearon señales univariantes y multivariantes y se determinó que la información originada de las señales univariantes resultaba limitada en comparación con las mayores posibilidades que presentaron las señales multivariantes. Mediante los métodos de calibración multivariada se pudo obtener información cuantitativa selectiva a partir de datos poco selectivos, posibilitándose la determinación simultánea de diversos componentes en muestras complejas. Esta posibilidad se traduce en que el tratamiento previo de la muestra se reduce al mínimo, lo que, a su vez, determina tiempos de análisis más cortos, aspectos ambos de gran importancia en los análisis de rutina o de control sobre gran cantidad de muestras análogas.

En todos los casos se desarrollaron métodos basados en espectroscopía de absorción electrónica acoplados a métodos de calibración multivariada, como PLS y redes neuronales artificiales. La aplicación de PLS como método quimiométrico para la resolución de señales instrumentales, se está convirtiendo en una práctica rutinaria en los laboratorios de control de calidad de fármacos. En el presente trabajo de tesis, la utilización de este método basado en la obtención de factores espectrales, permitió la resolución de mezclas de componentes con espectros muy solapados.

La aplicación de PLS-1 permitió la determinación simultánea de dexametasona fosfato y de los excipientes, creatinina y propilparabeno en inyectables, mediante la selección del número óptimo de factores por el método de validación cruzada y la aplicación de una estrategia de ventana móvil para determinar la región espectral de trabajo.

Para el caso del sistema dipirona y dextropropoxifeno en inyectables, además del solapamiento espectral que impide la cuantificación directa de los compuestos, las muestras comerciales reales presentan el problema adicional de la gran desproporción en las cantidades presentes de ambos principios activos y esto conduce a la presencia de no linealidades en el sistema de medición. Mediante la aplicación de modelos no lineales de PLS se consiguió una mejora en los resultados obtenidos para dipirona, pero con redes neuronales artificiales se resolvió de manera más eficiente la presencia de la no linealidad. Para el caso del dextropropoxifeno los resultados obtenidos con los modelos no lineales de PLS, no resultaron satisfactorios y fue necesario aplicar un método más robusto como las redes neuronales artificiales para alcanzar una mejora sustancial en los mismos. De esta manera se demostró el poder de las mismas para el modelado de no linealidades, y para el mejoramiento de los resultados respecto de los modelos lineales.

El problema analítico de la determinación de carbamazepina en muestras de suero humano, se resolvió desarrollando un método basado en una espectroscopia UV acoplada con una extracción optimizada del analito, con aplicación de PLS-1 a la segunda derivada de los datos espectrales. En este desarrollo, se determinó que en el paso de la extracción de la carbamazepina con el solvente orgánico, se originaba un efecto de corrimiento de la línea de base. Al trabajar con la señal derivada, se logró eliminar este efecto y mejorar la habilidad predictiva del modelo, disminuyendo la magnitud de los errores.

La determinación simultánea de permetrina e imidacloprid en pipetas pulguicidas de uso veterinario, se realizó mediante una medición espectral entre 200 y 350 nm y tratamiento de los datos obtenidos con PLS-1. Para mejorar los parámetros estadísticos de la calibración se realizó una selección de regiones, pero se encontró que los resultados obtenidos en la predicción eran mejores cuando se usaba el espectro completo, lo que demuestra que esta estrategia debe manejarse cuidadosamente.

Dado que en los desarrollos analíticos antes mencionados se obtuvieron parámetros comparables a los obtenidos por métodos oficiales, se puede concluir que los grandes avances en áreas de la quimiometría dedicadas al desarrollo de nuevos y mejores modelos de calibración multivariada y su acoplamiento a la espectroscopia de absorción electrónica, permiten desarrollar métodos analíticos rápidos, exactos, altamente precisos, sensibles, selectivos y económicos para ser utilizados en los laboratorios de control rutinario de la calidad de fármacos, como también en laboratorios dedicados a monitoreo de drogas.