



---

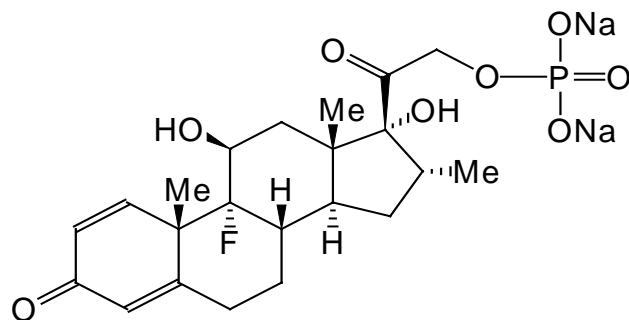
## CAPÍTULO 2

### *Desarrollos Analíticos*

## 2.1. DETERMINACIÓN DE DEXAMETASONA FOSFATO DE SODIO EN INYECTABLES

### 2.1.1. DEXAMETASONA FOSFATO DE SODIO. CARACTERÍSTICAS Y ANTECEDENTES ANALÍTICOS

La dexametasona fosfato de sodio (DEX), [21-fosfato disódico (9-fluor-11 $\beta$ , 17,21-trihidroxi-16 $\alpha$ -methylpregna-1,4-dieno-3,20-diona)] (Esquema 2.1), es un glucocorticoide sintético que posee una potente acción antiinflamatoria y prácticamente nula la potencia para retener Na(I). Se usa en el tratamiento del edema cerebral, por diferentes causas como tumores o traumatismos. Se emplea en administración parenteral en las unidades de terapia intensiva y en emergencias. Actúa como principio activo en distintos tipos de preparaciones farmacéuticas, como inyectables en forma intramuscular, endovenoso o intra-articular. Se aplica también en tratamientos locales para enfermedades de la piel, en gotas oftálmicas, y por inhalación para controlar los síntomas de asma y broncoespasmos (Godman Gilman, 1996).



Esquema 2.1: Fórmula estructural de la dexametasona fosfato de sodio

Cuando se usa en soluciones inyectables, esta acompañada por excipientes tales como metil y propilparabeno, creatinina, sulfito ácido de sodio, citrato de sodio e hidróxido de sodio (Martindale, 1993).

La Farmacopea Norteamericana USP XXIV (USP, 2000) y la Farmacopea Británica (BP, 1998) proponen la determinación de dexametasona mediante el empleo de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), con detección a 254 nm. Se han publicado trabajos científicos para la determinación en diferentes preparaciones farmacéuticas mediante espectroscopia UV (Chen, 1991; Xi, 1991), HPLC (Santos Montes, 1994; Liu, 1994; Gagne, 1980; Das-Gupta, 1979; Yao, 1988),

combinación de espectrofotometría derivada y métodos multivariados (Lemus-Gallego, 2001), espectrometría de masa múltiple (de-Wasch, 2000), cromatografía micelar electrocinética capilar (Lemus-Gallego, 2001), quimioluminiscencia mediante inyección de flujo (Wu, 2001) y cromatografía en capa delgada (Datta, 1993; Das, 1986). También se ha determinado en suero y orina empleando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (McWhinney, 1996), y en plasma por HPLC y derivatización fluorescente (Wu, 1995).

## 2.1.2. OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE DEXAMETASONA FOSFATO DE SODIO EN INYECTABLES

### 2.1.2.1. MÉTODO ANALÍTICO

En el presente trabajo se utilizó un método analítico espectrofotométrico para la determinación de fósforo, que puede adaptarse a diferentes muestras. El mismo, es un método colorimétrico basado en la reacción entre el grupo fosfato, obtenido en este caso por calcinación y el molibdato de sodio para dar fosfomolibdato. Luego, este último es reducido con ácido ascórbico a azul de molibdeno, leyéndose la absorbancia a una longitud de onda de 702 nm (Vanderlinde, 1971).

El procedimiento analítico seguido, tanto para las muestras comerciales como para las soluciones patrones, se detalla a continuación:

- En un tubo de vidrio de capacidad adecuada, se colocó 20.0  $\mu$ l de muestra y 80.0  $\mu$ l de solución de cloruro de magnesio. Este último se utiliza para evitar la volatilización del fósforo.
- Se secó el tubo en estufa a 100 °C durante 20 minutos.
- Se calcinó la muestra, colocando el tubo en la llama de un mechero durante dos minutos.
- Se realizó la reacción de color, agregando en el mismo tubo: 1.0 ml de reactivo A, 1.0 ml de reactivo B y 1.5 ml de reactivo C (Las composiciones de los reactivos A, B y C se detallan más adelante).
- Se homogeneizó el contenido colocando el tubo en un agitador vortex.
- Se incubó durante 15 minutos a 37 °C, colocando el tubo en baño termostático.
- Se transfirió de manera cuantitativa el contenido del tubo a un matraz aforado de 5.00 ml, agregando agua destilada hasta la marca.
- Se leyó la absorbancia a 702 nm.

#### 2.1.2.1.1. EQUIPAMIENTO

Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro marca Perkin Elmer, modelo Lambda 20, usando celdas de cuarzo de 1.00 cm de camino óptico. Los datos obtenidos fueron transferidos a una PC Pentium 1 GHz, para su tratamiento posterior. Las determinaciones por HPLC se realizaron en un cromatógrafo marca Shimadzu equipado con dos bombas, detector UV (215 nm) e inyector manual (20  $\mu$ l). Los programas utilizados para diseño experimental y para las pruebas estadísticas fueron: Unscrambler 7.6, Matlab 5.3 y Sigma Plot 5.0.

#### 2.1.2.1.2. REACTIVOS

Los reactivos necesarios para llevar a cabo el procedimiento analítico, se prepararon a partir de drogas calidad para análisis y de acuerdo a lo que se detalla a continuación:

- a- Reactivo A: se disolvieron 605 mg de molibdato de sodio dihidrato en 50.0 ml de agua destilada, se agregaron 10.7 ml de ácido clorhídrico concentrado y finalmente se ajustó el volumen a 100.0 ml.
- b- Reactivo B: se disolvieron 2.50 g de ácido ascórbico en 50.0 ml de agua destilada y luego se llevó a un volumen final de 100.0 ml.
- c- Reactivo C: se disolvieron 3.56 g de óxido de arsénico (III), 1.70 g de hidróxido de sodio y 3.00 g de citrato de sodio en 150 ml de agua destilada. Se ajustó el pH a 10.7 con ácido sulfúrico 2 mol l<sup>-1</sup> y se llevó a un volumen final de 200 ml.
- d- Solución de cloruro de magnesio: se preparó en agua destilada con una concentración de 1.5 10<sup>-3</sup> mol l<sup>-1</sup>.

Se preparó además una solución *stock* de dexametasona fosfato de sodio y un blanco de matriz a partir de los excipientes más usados en las preparaciones farmacéuticas, siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación:

- a- Solución *stock*: se disolvió dexametasona fosfato de sodio (sal disódica) en agua bidestilada, de manera de lograr una concentración de 1000.00  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>.
- b- Blanco de matriz: se preparó en agua destilada una solución de 800.00  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de creatinina, 300.00  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de propylparabeno, 2.02 mg ml<sup>-1</sup> de sulfito ácido de sodio, 1.13 mg ml<sup>-1</sup> de citrato de sodio y 1.60 mg ml<sup>-1</sup> de hidróxido de sodio.

Las muestras comerciales del inyectable que se analizaron, tenían un contenido declarado de dexametasona fosfato de sodio de 4 mg ml<sup>-1</sup> juntamente con los excipientes antes mencionados. Se

trabajó con dos marcas comerciales: Dexametasona Larjan (Laboratorios Larjan, Argentina) y Dexametasona Biocrom (Laboratorios Biocrom, Argentina).

### 2.1.2.2. OPTIMIZACIÓN

En el presente trabajo, se eligió como función objetivo una cifra de mérito: la precisión, y se trabajó para minimizar el coeficiente de variación (CV%) del método analítico.

En primer lugar se seleccionaron las variables más importantes, es decir los factores que tenían un efecto significativo sobre la respuesta elegida, utilizando un diseño experimental de Plackett-Burman (Morgan, 1995; Sanz, 1999).

Los factores estudiados fueron:

- Factor A: tiempo de calcinación
- Factor B: cantidad de solución de cloruro de magnesio agregada
- Factor C: uso o no de material volumétrico para obtener el volumen final de reacción
- Factor D: posición para el calentamiento durante la etapa de calcinación

Para calcular el coeficiente de variación, se realizaron cuatro replicados para cada experiencia.

En la Tabla 2.1 se muestran los niveles seleccionados para cada factor y la respuesta (CV%) obtenida.

Tabla 2.1: Análisis de los efectos con un diseño Plackett-Burman

Experimento	Factor A <sup>a</sup>	Factor B <sup>b</sup>	Factor C <sup>c</sup>	Factor D <sup>d</sup>	Respuesta: (CV%)
1	+	+	+	-	0.52
2	-	+	+	+	0.90
3	-	-	+	+	1.30
4	+	-	-	+	0.79
5	-	+	-	-	1.08
6	+	-	+	-	0.77
7	+	+	-	+	0.15
8	-	-	-	-	1.60

<sup>a</sup> Tiempo de calcinación: +, 2 min.; -, 1 min.

<sup>b</sup> Cantidad de cloruro de magnesio agregada (ml de solución  $1.5 \times 10^{-3}$  mol l<sup>-1</sup>): +, 0.050 ml; -, 0.030 ml.

<sup>c</sup> Uso o no de material volumétrico para obtener el volumen final: +, si; -, no.

<sup>d</sup> Posición en que se hizo el calentamiento en el paso de la calcinación: +, superior; -, inferior.

Para analizar los resultados obtenidos se aplicó una prueba de ANOVA y se determinó que los factores que tenían un efecto significativo, con una probabilidad asociada menor a 0.05 ( $p < 0.05$ ), eran el tiempo de calcinación y la cantidad de solución de cloruro de magnesio agregada. Por lo tanto, estos fueron los factores estudiados, a los fines de encontrar sus valores óptimos.

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.

En la Tabla 2.2 se muestran los niveles seleccionados para cada factor y la respuesta (CV%) obtenida.

Tabla 2.2: Diseño factorial completo a tres niveles para aplicar la metodología de superficie de respuesta

Experimento	Factor A <sup>a</sup>	Factor B <sup>b</sup>	Respuesta (CV%)
1	+1	-1	0.68
2	+1	0	1.30
3	+1	+1	1.13
4	0	-1	7.70
5	0	0	1.12
6	0	+1	5.28
7	-1	-1	4.20
8	-1	0	5.40
9	-1	+1	0.70

<sup>a</sup> Niveles para tiempo de calcinación: +1 = 4 min, 0 = 3 min y -1 = 2 min.

<sup>b</sup> Niveles para la cantidad de cloruro de magnesio agregada (ml de solución  $1.5 \times 10^{-3}$  mol l<sup>-1</sup>): +1 = 0.100, 0 = 0.060 y -1 = 0.020.

En la ecuación (2.1) se puede observar el modelo matemático polinómico utilizado:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_1 x_2 + \beta_4 x_1^2 + \beta_5 x_2^2 + \varepsilon \quad (2.1)$$

donde  $x_i$  son los factores analizados (A y B) y  $\beta_i$  son los coeficientes de regresión. Como se puede ver, la ecuación 2.1 incluye interacciones ( $\beta_3$ ) y términos cuadráticos ( $\beta_4$  y  $\beta_5$ ).

Mediante un ajuste por cuadrados mínimos se obtuvieron los siguientes parámetros:

$$y = 0.332 + 0.111 x_1 - 0.213 x_2 + 0.444 x_1 x_2 + 0.108 x_1^2 + 0.425 x_2^2 \quad (2.2)$$

De acuerdo al ajuste realizado y mediante la derivación de la ecuación 2.2, se encontró que los valores de los factores correspondientes a la mínima respuesta ( $CV\%=0.077$ ) y consecuentemente a la máxima precisión eran: tiempo de calcinación, 2 min (nivel: -1), y cantidad de solución de cloruro de magnesio, 0.080 ml (nivel: 0.8).

En la Figura 2.1 se puede observar la superficie de respuesta obtenida y en la Figura 2.2 las correspondientes gráficas de contorno.

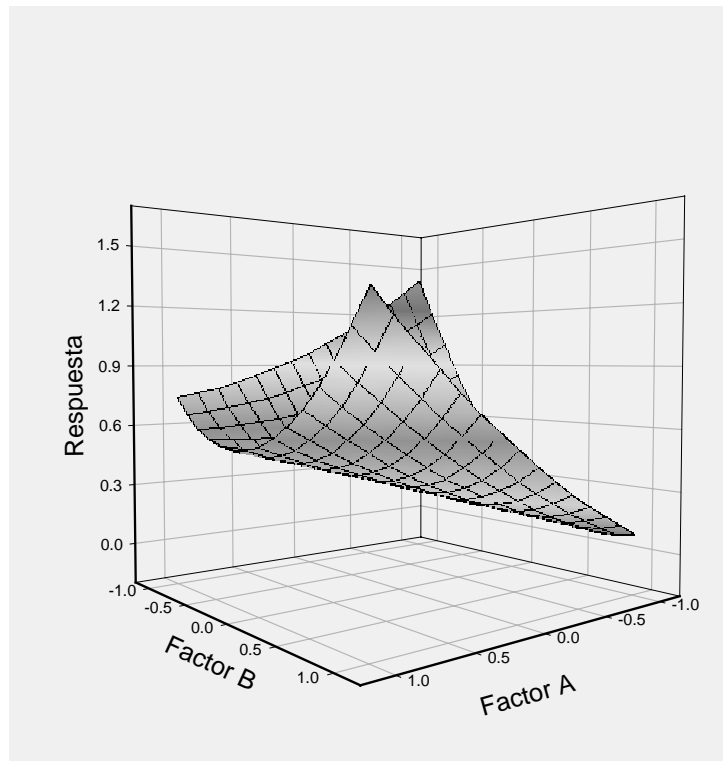


Figura 2.1: Superficie de respuesta estimada con un diseño factorial completo ( $3^2$ ) para tiempo de calcinación (Factor A) y cantidad de solución de cloruro de magnesio (Factor B)

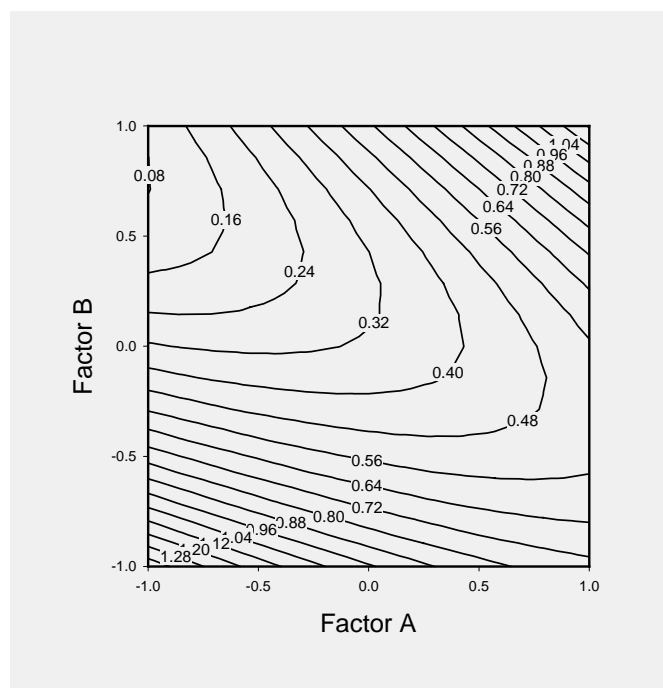


Figura 2.2: Gráfica de contorno correspondiente la Figura 2.1

### 2.1.2.3. VALIDACIÓN

Una vez determinados los valores óptimos de los factores con efecto significativo sobre la respuesta, se procedió a la validación del método analítico. Para esto se evaluaron los siguientes parámetros de funcionamiento:

#### *Linealidad:*

Se trabajó analizando soluciones patrones de cinco concentraciones diferentes, por triplicado. Se prepararon quince soluciones con: 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 y 6.0 g l<sup>-1</sup> de dexametasona fosfato de sodio, correspondientes a un intervalo que va del 50 al 150 % de las concentraciones usualmente presentes en las muestras comerciales (Green, 1996). Para describir la relación entre la absorbancia y la concentración de dexametasona fosfato de sodio, se utilizó regresión lineal ordinaria y los resultados obtenidos fueron:

$$\text{Absorbancia} = 123.8 + 84.7 \times \text{Concentración}$$

Dado que el valor del estadístico  $r^2$  fue 0.9982, se concluyó que el modelo explica el 99.82 % de la variabilidad en la absorbancia. Además se realizó la prueba de análisis de la varianza residual para evaluar linealidad y se determinó un rango lineal de 2.0 – 6.0 g l<sup>-1</sup>, siendo los límites de detección y de cuantificación los siguientes:  $LOD = 0.19$  g l<sup>-1</sup> y  $LOQ = 0.65$  g l<sup>-1</sup> respectivamente.



Por otra parte, se determinó que la sensibilidad analítica es:  $\gamma^{-1} = 0.065 \text{ g l}^{-1}$ , lo que representa un parámetro razonablemente bueno, si se tiene en cuenta que representa aproximadamente un 1.5 % de la concentración que daría un medicamento cuya dosis es del 100 %.

### Precisión

Para evaluar precisión se trabajó con muestras comerciales marca Biocrom. A los fines de evaluar repetibilidad y precisión intermedia, se realizaron diez determinaciones durante tres semanas consecutivas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.3, donde puede observarse que el CV% esta por debajo de 2 % para ambos tipos de imprecisión analizados.

Tabla 2.3: Resultados obtenidos en muestras comerciales en un estudio de precisión realizado durante tres semanas consecutivas

Muestras	Dexametasona fosfato de sodio encontrado (g l <sup>-1</sup> )		
	Semana 1	Semana 2	Semana 3
1	3.72	3.66	3.75
2	3.66	3.68	3.72
3	3.57	3.57	3.57
4	3.68	3.56	3.65
5	3.70	3.73	3.66
6	3.77	3.57	3.74
7	3.55	3.66	3.60
8	3.66	3.67	3.71
9	3.73	3.62	3.70
10	3.64	3.65	3.62
Promedio	3.67	3.64	3.67
Desviación estándar	0.067	0.056	0.062
CV%	1.88	1.53	1.68
Promedio general	3.66		
Desviación estándar general	0.062		
CV% general	1.69		

*Exactitud*

La exactitud del método analítico se evaluó de dos maneras: a) por medio de un experimento de recuperación y b) comparando los resultados obtenidos sobre muestras comerciales, con los de un método cromatográfico propuesto en la Farmacopea Americana (USP).

Para realizar el experimento de recuperación, se agregó una cantidad de dexametasona fosfato de sodio al blanco de matriz, correspondiente al 100 % de la concentración en las muestras comerciales. Luego, se realizaron diez determinaciones y se calculó el porcentaje de recuperación promedio, que resultó  $R = 100.3 \pm 0.5 \%$ .

Para realizar la comparación de métodos, se trabajó sobre cuatro muestras comerciales, las que se analizaron por triplicado con el método cromatográfico y el presente método espectrofotométrico. Los valores medios se compararon mediante una prueba *t* y se determinó que no había diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4: Análisis comparativo con el método cromatográfico propuesto la USP. Resultados obtenidos sobre cuatro muestras comerciales mediante aplicación de ambos métodos

Muestras (lotes diferentes)	Método Espectrofotométrico <sup>a</sup>	Método Cromatográfico <sup>b</sup> (g l <sup>-1</sup> )	<i>t student</i>
1	3.80 (0.05)	3.71 (0.04)	2.44 (DENS) <sup>c</sup>
2	3.78 (0.04)	3.87 (0.04)	2.74 (DENS) <sup>c</sup>
3	3.72 (0.08)	3.69 (0.05)	0.55 (DENS) <sup>c</sup>
4	3.59 (0.07)	3.72 (0.06)	2.44 (DENS) <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Tres replicados. Valores entre paréntesis corresponden a desviación estándar.

<sup>b</sup> Tres replicados. Valores entre paréntesis corresponden a desviación estándar.

<sup>c</sup> DENS: diferencia estadísticamente no significativa considerando que el valor tabulado del estadístico es 2.78 para un nivel de significancia igual a 0.05.

#### 2.1.2.4. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se optimizó un método simple y rápido para la determinación de dexametasona fosfato de sodio en inyectables, basado en la reacción del grupo fosfato obtenido por calcinación con molibdato de sodio y ácido ascórbico para dar azul de molibdeno. Posteriormente se lo validó y se determinó que los parámetros de funcionamiento respecto a exactitud y precisión eran muy buenos.

Con respecto al análisis convencional por HPLC, el presente método tiene la ventaja de que es más adecuado para el caso en que se debe analizar una gran cantidad de muestras, por la reducción sustancial del tiempo de análisis, siendo, por otra parte mucho más económico. Por esta razón, se concluye que el mismo puede ser utilizado en el laboratorio para el control de calidad del inyectable estudiado.

#### 2.1.3. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE DEXAMETASONA FOSFATO DE SODIO Y DE DOS EXCIPIENTES (CREATININA Y PROPILPARABENO) EN INYECTABLES

##### 2.1.3.1. MÉTODO ANALÍTICO

En el presente trabajo 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 inyectables. Como método de calibración multivariada se utilizó PLS-1.

El procedimiento analítico seguido, tanto para las muestras comerciales como para las muestras de calibración y validación, se detalla a continuación:

- a- Se realizó una dilución de las muestras, tomando un volumen de 1.00 ml y llevando con agua bidestilada a 500.00 en matraz aforado.
- b- Se obtuvieron los espectros de absorción electrónica en el rango 200-350 nm.

##### 2.1.3.1.1. EQUIPAMIENTO

Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro marca: Perkin Elmer, modelo: Lambda 20, usando celdas de cuarzo de 1.00 cm de camino óptico. Los espectros de absorción electrónica fueron convertidos a formato ASCII y se transfirieron a una PC Pentium 550, para su tratamiento posterior. Las determinaciones por HPLC se realizaron en un cromatógrafo marca Shimadzu equipado con dos bombas, detector UV (215 nm) e inyector manual (20 µl).

El método PLS-1 se aplicó utilizando el programa MULTIVAR (Goicoechea, 2000). Para el análisis de regresión y el tratamiento estadístico de los datos, se utilizó el programa Sigma Plot 5.0.

### *Programa MULTIVAR*

El programa MULTIVAR está escrito en Visual Basic 5.0 y tiene las siguientes funciones:

#### 1. General: funciones generales y procesamiento de datos.

- 1) Selección del método: permite seleccionar el método multivariado de trabajo (PCR, PLS-1, HLA, etc.).
- 2) Tipo de datos utilizados (*Data Type*): los datos pueden ser tipo ASCII\_X,Y, correspondientes a archivos en formato ASCII conteniendo dos columnas, una con las longitudes de onda y otra con los valores de respuesta (absorbancias), y tipo ASCII\_X, correspondientes a una columna con las respuestas.
- 3) Centrado de los datos (*Center Data*): se activa por defecto y permite realizar el centrado de los datos.
- 4) Rango de los sensores (*Range of sensors*): se pueden definir hasta tres diferentes rangos de los sensores. Estos deben ser especificados en términos del número de entrada en el archivo formato ASCII correspondiente y no del valor específico del sensor. Por ejemplo, cuando el rango es 210-300 nm, corresponde asignar 1-91.
- 5) Salir (*Quit Program*): permite terminar con la aplicación del programa y volver a *Windows*.

#### 2. Validación cruzada (*Cross Validation*)

- 1) Archivo de calibración (*Calibration File*): permite seleccionar el disco, directorio y archivo de trabajo. Este último archivo debe ser de formato ASCII y contener la información relativa a las muestras de calibración, concentraciones y nombres de los archivos con los espectros correspondientes.
- 2) Cálculo del *PRESS* en función del número de factores (*PRESS Factors*): permite asignar el número máximo de factores utilizados para realizar la validación cruzada.

- 3) Nombre del archivo para grabar los resultados del cálculo del *PRESS* (*Filename for saving PRESS results*): se debe colocar el nombre del archivo donde se guardarán los resultados de la validación cruzada. El nombre por defecto es *PRESS.TXT*, pero puede ser cambiado.
- 4) Validación cruzada (*Cross Validation*): botón que permite iniciar los cálculos de validación cruzada. Los resultados aparecen en una nueva ventana, desde la que se puede regresar a la ventana principal con el botón menú principal (*main menu*).
- 5) Ventana *PRESS* (*PRESS Screen*): botón que permite ver la ventana con los resultados de validación cruzada.

### 3. Calibración y predicción (*Calibration and Prediction*)

- 1) Número de factores (*Number of Factors*): se coloca el número óptimo de factores obtenido por validación cruzada.
- 2) Scores de PLS o PCR (*PCR or PLS Scores*): esta opción permite guardar los scores en un archivo (en PCR son llamados *T1.TXT*, *T2.TXT*, etc., mientras que en PLS son llamados *TA1.TXT*, *TA2.TXT*, etc.). Estos nombres no pueden ser cambiados. En los métodos basados en cálculos de NAS no hay scores.
- 3) Coeficientes de regresión (*Regression Coefficients*): permite guardar los coeficientes de regresión (archivo *BF.TXT*, cuyo nombre puede ser cambiado).
- 4) Archivo de informe (*Report File*): nombre del archivo para guardar el informe de la predicción (por defecto es *REPORT.TXT* y puede ser cambiado).
- 5) Calibración (*Calibrate*): permite realizar la calibración. En este caso, se crean archivos llamados *R1*, *R2*, etc. La información guardada depende del método de trabajo seleccionado: en PCR contienen factores espectrales de la matriz de datos, en PLS contienen residuos en señales y concentraciones, *weight loading factors* y *loading factors*, y en métodos basados en cálculos de NAS, contienen factores espectrales de la matriz  $R_k$ . También se crean archivos llamados *BNAS1*, *BNAS2*, etc., que contienen factores espectrales de la matriz  $R_k$  (para PCR y PLS), cuyos nombres no pueden ser cambiados. Los resultados concernientes a sensibilidad y selectividad aparecen en una nueva ventana, desde la que se puede volver accionando *main menu*.
- 6) Pantalla con los resultados (*Results Screen*): permite volver a ver la pantalla con los resultados de calibración.

- 7) Nombre del archivo de la muestra (*Sample Filename*): se tienen dos opciones. Simple (*Single*), que permite seleccionar el archivo conteniendo el espectro de una muestra desconocida y Múltiple (*Multiple*), que permite la selección de un archivo de texto conteniendo una lista de archivos correspondientes a espectros de muestras incógnitas.
- 8) Archivo con los residuos (*Residues File*): nombre del archivo donde se guardan los residuos espectrales. El nombre por defecto es RESIDUES.TXT puede ser cambiado.
- 9) Archivo NASRP (*NASRP file*): nombre del archivo donde se guardan los datos para la construcción de las NASRP (que contiene dos columnas, la primera es la NAS del analito puro 10) y la segunda es la NAS de la muestra). El nombre por defecto es NAS.TXT y puede ser cambiado.
- 11) Predicción (*Predict*): botón para realizar la predicción. Los resultados aparecen en una nueva ventana desde la que se puede regresar accionando *main menu*.
- 12) Pantalla de resultados (*Results Screen*): permite volver a observar la ventana con los resultados de la predicción.

#### 4. Selección de variables (*Variable Selection*)

- 1) Ventana espectral (*Spectral Window*): se especifica el mínimo tamaño de la ventana utilizada para calcular el error indicador (EI).
- 2) Selección de factores (*Selection Factors*): se especifica el número máximo de factores para calcular EI.
- 3) Archivo para selección de PRESS (*PRESS Select file*): nombre del archivo para guardar los resultados de la selección del PRESS. El nombre por defecto es SELPRESS.TXT y puede ser cambiado.
- 4) Archivo para el error indicador (EI) de la muestra (*Sample EI file*): nombre del archivo para guardar los valores de EI para una muestra dada en función del primer sensor y la ventana. El archivo EI.TXT contiene cinco columnas: primer sensor, ventana espectral, EI, número óptimo de factores y concentración predicha. El nombre puede ser cambiado.
- 5) Selección de la muestra (*Sample Select*): botón para comenzar la selección para una muestra dada. Esta operación puede ser lenta, dependiendo del ancho espectral elegido. Los resultados correspondientes al EI mínimo aparecen en una nueva pantalla, desde la que se puede regresar a la pantalla principal apretando *main menu*.

- 6) Selección del *PRESS* (*PRESS Select*): comienza la selección basada en la búsqueda del *PRESS* mínimo. Esta operación puede ser lenta, dependiendo del ancho espectral elegido. Los resultados correspondientes al *PRESS* mínimo aparecen en una nueva pantalla, desde la que se puede regresar a la pantalla principal apretando *main menu*.
- 7) Pantalla de selección (*Select Screen*): permite volver a ver la pantalla con los resultados de la selección.

La pantalla del programa está dividida en cuatro regiones horizontales, como puede observarse en la Figura 2.3.

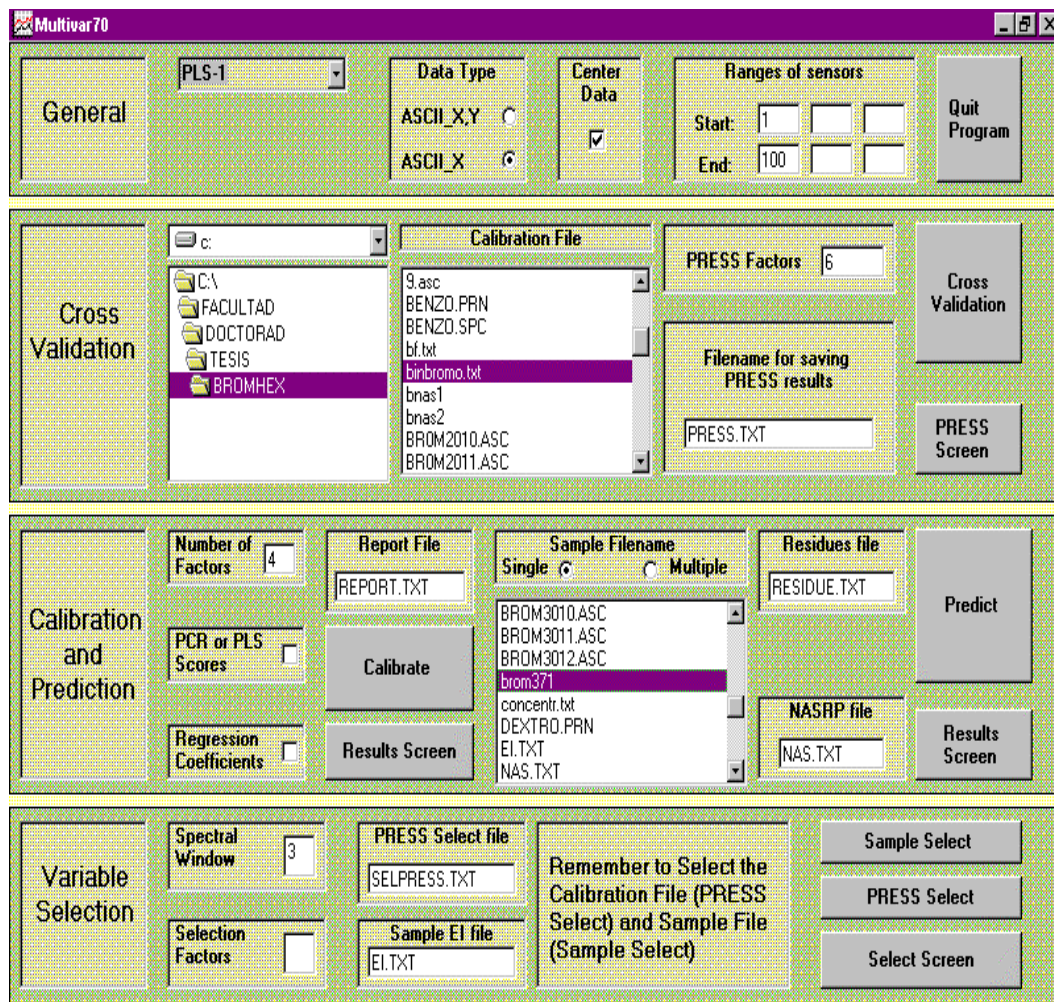


Figura 2.3: Pantalla del programa MULTIVAR

### 2.1.3.1.2. REACTIVOS

Los reactivos necesarios para realizar el procedimiento analítico, se prepararon a partir de drogas calidad para análisis y de acuerdo a lo que se detalla a continuación:

- a) Solución *stock* de dexametasona fosfato de sodio: se disolvió dexametasona fosfato de sodio (sal disódica) en agua bidestilada, de manera de lograr una concentración de 600.00 mg l<sup>-1</sup>.
- b) Solución *stock* de creatinina: se preparó una solución de 800.00 mg l<sup>-1</sup> por disolución de la droga sólida en agua bidestilada.
- c) Solución *stock* de propilparabeno: se preparó una solución de 300.00 mg l<sup>-1</sup> por disolución de la droga sólida en agua bidestilada.
- d) Solución *stock* de excipientes restantes: se preparó por una solución conteniendo 2.02 mg ml<sup>-1</sup> de sulfito ácido de sodio, 1.13 mg ml<sup>-1</sup> de citrato de sodio y 1.60 mg ml<sup>-1</sup> de hidróxido de sodio en agua destilada.

Se trabajó además, con una muestra comercial: Dexametasona Larjan (Laboratorios Veinfar, Argentina), con un contenido (por ml) de 4.0 mg de dexametasona fosfato de sodio, 6.4 mg de creatinina y 1.4 mg de propilparabeno.

### 2.1.3.1.3. DISEÑO DEL JUEGO DE MUESTRAS DE CALIBRACIÓN

Para la calibración, se preparó un juego de 15 muestras siguiendo un diseño central compuesto. Las muestras se prepararon por dilución de una cantidad adecuada de las soluciones *stock*, 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 (Green, 1996). Además, se verificó que las concentraciones seleccionadas se encuentren dentro del rango de respuesta lineal. En la Tabla 2.5 se puede observar la composición de estas muestras.



Tabla 2.5: Composición del juego de muestras de calibración de acuerdo a un diseño central compuesto para la aplicación del método PLS-1

Muestras de calibración	DEX (mg L <sup>-1</sup> )	CRE (mg L <sup>-1</sup> )	PRO (mg L <sup>-1</sup> )	Excipientes (%) <sup>a</sup>
1	2.50	4.00	0.85	100
2	2.50	4.00	3.20	100
3	2.50	15.00	0.85	100
4	2.50	15.00	3.20	100
5	9.50	4.00	0.85	100
6	9.50	4.00	3.20	100
7	9.50	15.00	0.85	100
8	9.50	15.00	3.20	100
9	0.00	9.50	2.00	100
10	12.00	9.50	2.00	100
11	6.00	0.00	2.00	100
12	6.00	19.20	2.00	100
13	6.00	9.50	0.00	100
14	6.00	9.50	4.00	100
15	6.00	9.50	2.00	100

<sup>a</sup> El % es relativo al blanco usual del inyectable comercial.

#### 2.1.3.1.4. DISEÑO DE LOS JUEGOS DE MUESTRAS DE VALIDACIÓN

Se trabajó con dos juegos de muestras de validación. Para el juego número uno, se prepararon tres grupos de 15 muestras cada uno, los que fueron analizados en tres semanas consecutivas de trabajo. Estas muestras contenían tres niveles diferentes de los compuestos estudiados, en concentraciones similares a la de las muestras comerciales  $\pm 20\%$  y un nivel de los otros excipientes correspondiente al 100% (ver Tabla 2.6). Las muestras se prepararon por dilución de cantidades adecuadas de las soluciones *stock*. Esta experiencia permitió determinar la exactitud y la precisión intra e inter-ensayo del método analítico.

Tabla 2.6: Composición del juego número uno de muestras de validación

Muestras de validación	DEX (mg l <sup>-1</sup> )	CRE (mg l <sup>-1</sup> )	PRO (mg l <sup>-1</sup> )	Excipientes (%) <sup>a</sup>
1	6.40	12.80	2.70	100
2	6.40	12.80	2.70	100
3	6.40	12.80	2.70	100
4	6.40	12.80	2.70	100
5	6.40	12.80	2.70	100
6	8.00	12.80	2.70	100
7	8.00	12.80	2.70	100
8	8.00	12.80	2.70	100
9	8.00	12.80	2.70	100
10	8.00	12.80	2.70	100
11	9.60	12.80	2.70	100
12	9.60	12.80	2.70	100
13	9.60	12.80	2.70	100
14	9.60	12.80	2.70	100
15	9.60	12.80	2.70	100

<sup>a</sup> El % es relativo al blanco usual del inyectable comercial.

El juego número dos, consistió en quince muestras preparadas con concentraciones de dexametasona fosfato de sodio comprendidas en el intervalo: 50 a 150%, de la cantidad usualmente presente en las muestras comerciales.

A partir de esta experiencia, se calculó el % de recuperación y 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.

### 2.1.3.2. RESULTADOS

En la Figura 2.4, se muestran los espectros de dexametasona, creatinina y propilparabeno en soluciones acuosas. Como puede observarse, existe un fuerte solapamiento de los componentes, lo que impide el análisis por espectroscopia convencional.

En el presente trabajo se aplicó PLS-1, que como se discutió en el Capítulo Introducción, es uno de los métodos de calibración multivariada más comúnmente utilizados para resolver este tipo de mezclas.

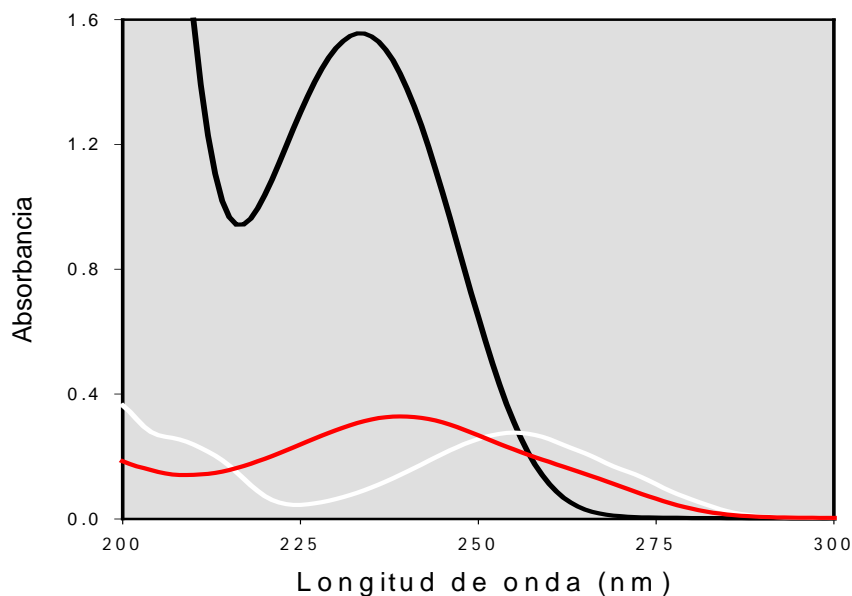


Figura 2.4: Espectros de absorción electrónica en solución acuosa para: dexametasona ( $8.0 \text{ mg l}^{-1}$  (rojo)), creatinina ( $12.8 \text{ mg l}^{-1}$  (negro)) y propilparabeno ( $2.7 \text{ mg l}^{-1}$  (blanco))

La selección del número óptimo de factores a usar con el algoritmo de PLS-1 durante la etapa de calibración, es un aspecto fundamental para alcanzar un mejor funcionamiento en la etapa de predicción. Esto permite modelar el sistema con la cantidad óptima de información, evitando el sobreajuste. Para esto se utilizó el procedimiento de validación cruzada y el criterio de Haaland y Thomas (Haaland, 1988).

La selección de la región espectral de trabajo, también es un punto crítico en el análisis multivariado, ya que permite disminuir los errores de predicción al eliminar zonas sin información y/o datos altamente correlacionados. En el presente trabajo, se aplicó una estrategia de ventana móvil a los fines de encontrar la región óptima para la calibración. Mediante esta estrategia, se determinó la zona del

espectro con mayor cantidad de información, por localización del *PRESS* mínimo (Collado, 2000; Luis, 2001).

La Tabla 2.7 muestra: el número óptimo de factores encontrado, la región espectral óptima y los parámetros estadísticos indicadores de la calidad del ajuste realizado.

Tabla 2.7: Número óptimo de factores, región espectral óptima y parámetros estadísticos indicadores de la calidad del ajuste realizado con PLS-1

	Dexametasona	Creatinina	Propilparabeno
Región espectral (nm)	220-320	240-280	260-340
Nº de Factores	4	4	4
<i>PRESS</i> (mg l <sup>-1</sup> × 10 <sup>5</sup> ) <sup>2</sup>	0.0796	0.0716	0.0242
<i>RMSECV</i> (mg l <sup>-1</sup> × 10 <sup>5</sup> )	0.075	0.0691	0.0402
<i>REP</i> %	1.311	0.97	0.97
<i>r</i> <sup>2</sup>	0.9995	0.9998	0.9997

Este modelo de calibración óptimo para PLS-1, se aplicó para predecir las concentraciones de los componentes en las muestras reales y en las muestras sintéticas. En las Tablas 2.8 y 2.9, se presentan los resultados obtenidos para el juego de muestras de validación número uno.

Tabla 2.8: Resultados del análisis por PLS-1 para dexametasona en el juego de muestras de validación número uno

Muestra de validación	Dexametasona						
	Cantidad adicionada (mg l <sup>-1</sup> )	Semana 1		Semana 2		Semana 3	
		Cantidad encontrada (mg l <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)	Cantidad encontrada (mg l <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)	Cantidad encontrada (mg l <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)
1	6.40	6.40	100.0	6.36	99.4	6.57	102.7
2	6.40	6.59	103.0	6.54	102.2	6.53	102.0
3	6.40	6.51	101.7	6.51	101.7	6.58	102.8
4	6.40	6.56	102.5	6.57	102.6	6.57	102.7
5	6.40	6.57	102.6	6.47	101.1	6.60	103.1
6	8.00	8.03	100.4	8.19	102.4	8.31	103.9
7	8.00	8.08	101.0	8.12	101.5	8.22	102.7
8	8.00	8.11	101.4	8.15	101.9	8.25	103.1
9	8.00	8.05	100.6	8.21	102.6	8.30	103.7
10	8.00	8.10	101.2	8.20	102.5	8.18	102.2
11	9.60	9.64	100.4	9.79	102.0	9.91	103.2
12	9.60	9.68	100.8	9.78	101.9	9.87	102.8
13	9.60	9.65	100.5	9.83	102.4	9.88	102.9
14	9.60	9.75	101.6	9.89	103.0	9.80	102.1
15	9.60	9.66	100.6	9.88	102.9	9.92	103.3

Tabla 2.9: Resultados del análisis por PLS-1 para creatinina y propilparabeno en el juego de muestras de validación número uno

	Creatinina			Propilparabeno		
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 1	Semana 2	Semana 3
Cantidad adicionada (mg l <sup>-1</sup> )	12.80	12.80	12.80	5.40	5.40	5.40
Cantidad encontrada <sup>a</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	12.87(0.06)	13.07 (0.03)	13.01 (0.03)	5.51 (0.05)	5.72 (0.07)	5.67 (0.05)
% Recuperación promedio intra-ensayo	100.5	102.1	101.7	102.1	106.0	105.0
CV % Intra-assay	0.50	0.31	0.24	0.97	1.17	0.94

<sup>a</sup> Los valores entre paréntesis corresponden a desviación estándar. (n = 15).

Como puede apreciarse, analizando el juego de validación número uno se obtuvieron porcentajes de recuperación aceptables para dexametasona, creatinina y propilparabeno, con un promedio de 102.0, 101.4 y 104.3 respectivamente. Además, se aplicó una prueba de ANOVA y se determinó que no existía una diferencia estadísticamente significativa entre las medias obtenidas en las tres semanas consecutivas.

Los resultados obtenidos para dexametasona en el juego de muestras de validación número dos y en una muestra comercial marca Larjan, se presentan en la Tabla 2.10.

Tabla 2.10: Resultados del análisis por PLS-1 para dexametasona en el juego de muestras de validación número dos y en una muestra comercial del inyectable

Muestra <sup>a</sup>	Dexametasona (mg ml <sup>-1</sup> )		
	Cantidad adicionada	Cantidad encontrada	Recuperación (%)
1	9.05	9.37	103.5
2	8.40	8.49	101.1
3	7.87	8.01	101.8
4	7.24	7.49	103.4
5	6.97	7.10	101.9
6	6.61	6.67	100.9
7	6.34	6.50	102.5
8	6.06	6.01	99.2
9	5.70	5.68	99.6
10	5.43	5.46	100.5
11	5.16	5.11	99.0
12	4.80	4.77	99.4
13	4.25	4.23	99.5
14	3.62	3.64	100.5
15	2.99	3.04	101.7
Larjan <sup>b</sup>	4.00	4.01	100.3

<sup>a</sup> Se realizaron cinco replicados.

<sup>b</sup> La recuperación obtenida por HPLC (USP XXIV) fue 99.5 %.

Como puede verse, los porcentajes de recuperación obtenidos en el juego de muestras de validación número dos fueron muy buenos para todos los niveles estudiados. Por otra parte, cuando se trabajó con una muestra comercial, se obtuvo un resultado comparable al de la muestra analizada por HPLC (USP XXIV, 2000).

A partir de los resultados obtenidos al analizar el juego de muestras de validación anterior, se construyó un gráfico de  $C_{predicha}$  vs.  $C_{adicionada}$ . Los resultados obtenidos fueron: pendiente = 1.015 y ordenada al origen = - 0.05. La Figura 2.5 muestra la región elíptica de confianza conjunta (EJCR) para la pendiente y la ordenada al origen, la que contiene el valor (1,0) teóricamente esperado. Esto permite concluir que no hay evidencia de error sistemático en la determinación de la dexametasona, cuando se usa la metodología propuesta en la presente tesis.

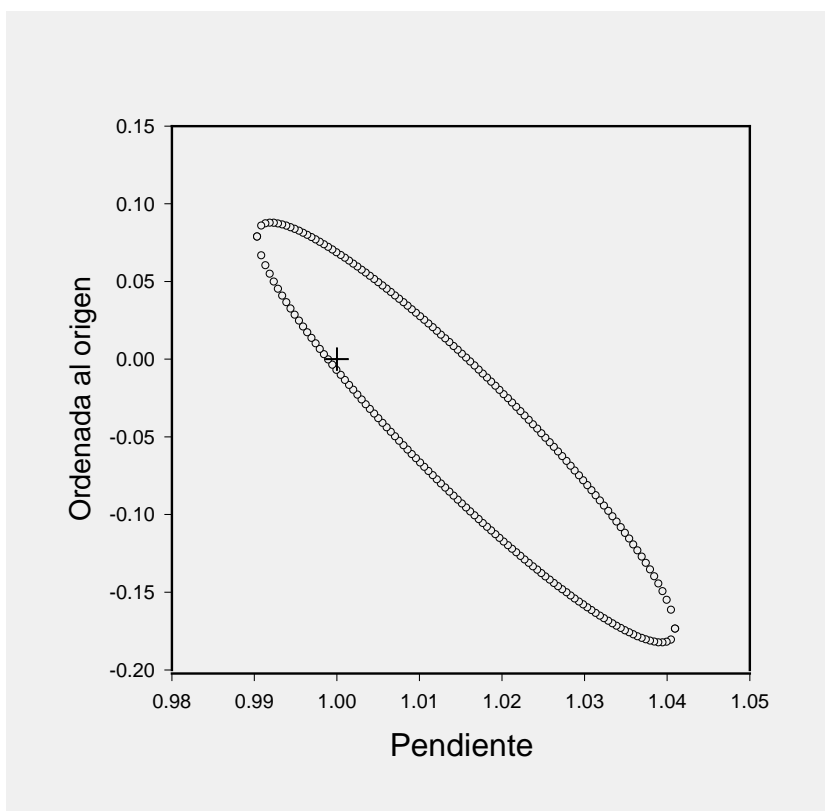


Figura 2.5: Región elíptica de confianza conjunta para la pendiente y la ordenada al origen, para la dexametasona en el juego de muestras de validación número dos

### 2.1.3.3. CONCLUSIONES

Mediante la aplicación del método desarrollado en el presente trabajo a muestras sintéticas y comerciales, se obtuvieron porcentajes de recuperación y coeficientes de variación muy buenos desde el punto de vista analítico. Además la aplicación de una prueba estadística rigurosa como lo es la región elíptica de confianza conjunta para la pendiente y la ordenada al origen, mostró que no hay evidencias de error sistemático para la determinación de dexametasona. Un hecho para destacar es la reducción sustancial que se alcanza en el tiempo de análisis y en los costos, en comparación con el método basado en HPLC.

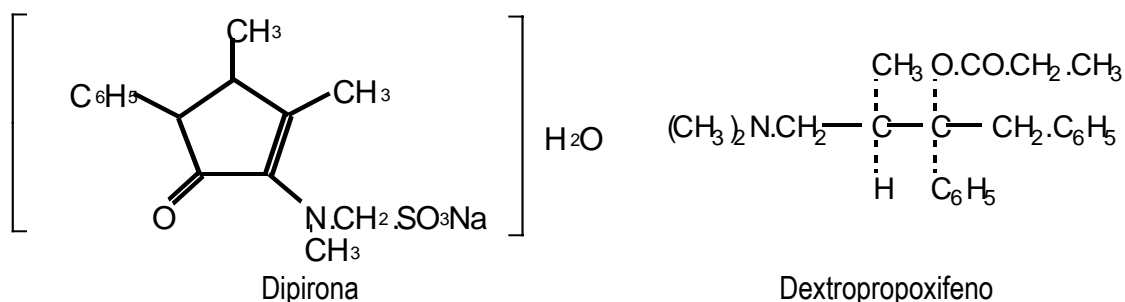
Por todo lo expuesto, se concluye que el presente método puede utilizarse en el laboratorio de control de calidad, para el análisis de las muestras del inyectable estudiado, como una alternativa válida al HPLC.



## 2.2. DETERMINACIÓN DE DEXTROPROPOXIFENO Y DAPIRONA EN INYECTABLES

### 2.2.1. DEXTROPROPOXIFENO Y DAPIRONA. CARACTERÍSTICAS Y ANTECEDENTES ANALÍTICOS

La dipirona (DIP) (sodio *N*-(2,3-dimetil-5-oxo-1-fenil-3-pirazolin-4-yl)-*N*-metilaminometanosulfonato monohidrato), es un analgésico-antipirético del grupo pirazolónico, usado para el tratamiento del dolor agudo (Goodman-Gilman, 1996) en casos de cefaleas, neuralgias, dolores reumáticos, cólico renal y del período postoperatorio. Este fármaco puede ser administrado vía oral, intramuscular o intravenosa y vía rectal. Usualmente la forma inyectable es una solución que contiene además de dipirona, dextropropoxifeno (DEX) ((+)-(1*S*, 2*R*)-1-Bencil-3-dimetilamino-2-metil-1-fenil-propil propionato). Las fórmulas estructurales de ambos principios activos se presentan en el Esquema 2.2.



Esquema 2.2: Fórmula estructural de la Dipirona y el dextropropoxifeno

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica más utilizada para la determinación de estos compuestos (Fadnavis, 2001). Sin embargo, los trabajos publicados en la literatura científica se refieren a la determinación de los mismos en forma separada, es decir en preparaciones farmacéuticas independientes, o bien en mezclas diferentes, no existiendo un antecedente analítico para la determinación simultánea.

### 2.2.2. MÉTODO ANALÍTICO

En el presente trabajo se desarrolló un método analítico para la determinación simultánea de dextropropoxifeno y dipirona en inyectables, basado en el tratamiento de datos espectrofotométricos con métodos no lineales de calibración multivariada.

Los ingredientes activos mencionados, se presentan en el preparado farmacéutico analizado en proporciones altamente diferentes (Relación Dipirona/Dextropropoxifeno = 32:1). Por esta razón, al intentar una determinación espectrofotométrica simultánea de estos componentes, se puede postular

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. En el presente trabajo de tesis se solucionó la dificultad planteada mediante la aplicación de una herramienta quimiométrica poderosa: las redes neuronales artificiales (ANNs).

El procedimiento analítico seguido para las muestras comerciales se detalla a continuación:

- c- Se realizó una dilución 1/2500 de las muestras, utilizando ácido HCl 0.01 mol l<sup>-1</sup>.
- d- Se obtuvieron los espectros de absorción electrónica en el rango 200-350 nm.

#### 2.2.2.1. EQUIPAMIENTO

Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro marca: Perkin Elmer, modelo: Lambda 20, usando celdas de cuarzo de 1.00 cm de camino óptico. Los espectros de absorción electrónica fueron convertidos a formato ASCII y se transfirieron a una PC Pentium 550, para su tratamiento posterior.

Los cálculos se realizaron utilizando el programa MATLAB 5.3 (MATLAB 5.3, 1999), con rutinas para aplicación de PLS-1, NL-PLS, SPL-PLS y ANNs escritas en el laboratorio sobre la base de algoritmos conocidos y *toolboxes* de MATLAB (Haaland, 1988; Zupan, 1999). La selección de la región espectral óptima se realizó aplicando la estrategia de ventana móvil-mínimo PRESS (Collado, 2000), mediante una rutina de MATLAB.

Las determinaciones por HPLC se realizaron en un cromatógrafo marca Shimadzu con las siguientes características técnicas: dos bombas, detector UV (215 nm) e inyector manual (20 µl). Se utilizó una columna LiChrospher 100, C18, 5 µm, 250 x 4 mm ID., Merck. La temperatura de la columna se fijó en 35 °C y se trabajó con una fase móvil de la siguiente composición: bomba A, (60%) NaClO<sub>4</sub> 0.20 mol l<sup>-1</sup>, trietanolamina 0.20% (v/v), pH2.3 y bomba B, (40%) acetonitrilo.

#### 2.2.2.2. REACTIVOS

Los reactivos necesarios para realizar el procedimiento analítico, se prepararon a partir de drogas calidad para análisis y de acuerdo a lo que se detalla a continuación:

- e) Solución *stock* de dipirona: se disolvió la droga sólida en agua bidestilada, de manera de lograr una concentración de 5.00 g l<sup>-1</sup>.

- f) Solución *stock* de dextropropoxifeno: se disolvió la droga sólida en agua bidestilada, de manera de lograr una concentración de 5.00 g l<sup>-1</sup>.

Se trabajó además con un inyectable comercial marca Klosidol (Laboratorios Bagó, Argentina), con un contenido (por 5 ml) de 50 mg de dextropropoxifeno y 1500 mg de dipirona. Como se especificó anteriormente al describir el procedimiento analítico, esta muestra se diluyó 1/2500 con ácido clorhídrico 0.01 mol l<sup>-1</sup> antes de realizar su medición espectrofotométrica. Las concentraciones de trabajo resultantes fueron: dextropropoxifeno, 4 mg l<sup>-1</sup> y dipirona, 120 mg l<sup>-1</sup>.

#### 2.2.2.3. DISEÑO DE LOS JUEGOS DE MUESTRAS DE CALIBRACIÓN

Para la calibración se prepararon dos juegos de doce muestras cada uno, es decir que en total se trabajó con veinticuatro muestras. La concentración de los componentes en estas muestras corresponde a un diseño central compuesto con cuatro muestras centrales. Estos juegos fueron preparados en diferentes días, a los fines de tener en cuenta la máxima variabilidad posible en los datos.

En la Tabla 2.11 se muestra la composición de las muestras de calibración.

#### 2.2.2.4. DISEÑO DE LOS JUEGOS DE MUESTRAS DE VALIDACIÓN

Para la validación se prepararon dos juegos de doce muestras cada uno, es decir que en total se trabajó con veinticuatro muestras. La concentración de los componentes de estas muestras corresponde a un diseño factorial completo, con cuatro niveles para dextropropoxifeno y tres de dipirona. Cuando se trabajó con los modelos lineales y no lineales de PLS, se usó uno de estos juegos para la validación, mientras que cuando se trabajó con redes neuronales, se usó uno de estos juegos para monitoreo y el otro para validación.

En la Tabla 2.12 se muestra la composición de las muestras de validación.

Tabla 2.11: Composición del juego de muestras de calibración para los métodos: PLS-1, NL-PLS, SPL-PLS y ANNs

Número de muestra de calibración	Dipirona (mg l <sup>-1</sup> )	Dextropropoxifeno (mg l <sup>-1</sup> )
1	120.00	3.00
2	110.00	4.00
3	115.00	3.50
4	125.00	3.50
5	130.00	4.00
6	115.00	4.50
7	125.00	4.50
8	120.00	5.00
9	120.00	4.00
10	120.00	4.00
11	120.00	4.00
12	120.00	4.00

Tabla 2.12: Composición del juego de muestras de validación para los métodos: PLS-1, NL-PLS, SPL-PLS y ANNs

Número de muestra de calibración	Dipirona (mg l <sup>-1</sup> )	Dextropropoxifeno (mg l <sup>-1</sup> )
1	115.00	3.50
2	125.00	3.50
3	115.00	3.80
4	125.00	3.80
5	115.00	4.00
6	125.00	4.00
7	115.00	4.30
8	125.00	4.30
9	120.00	3.50
10	120.00	3.80
11	120.00	4.00
12	120.00	4.30

### 2.2.3. RESULTADOS

En la Figura 2.6A se pueden observar los espectros de dipirona y dextropropoxifeno, en solución acuosa a pH 2.0 y en concentraciones iguales ( $10 \text{ mg l}^{-1}$ ). En la Figura 2.6B se muestran los espectros para ambos componentes, pero con las concentraciones correspondientes a la muestra diluida 1/2500: dextropropoxifeno,  $4 \text{ mg l}^{-1}$ , y dipirona,  $120 \text{ mg l}^{-1}$ .

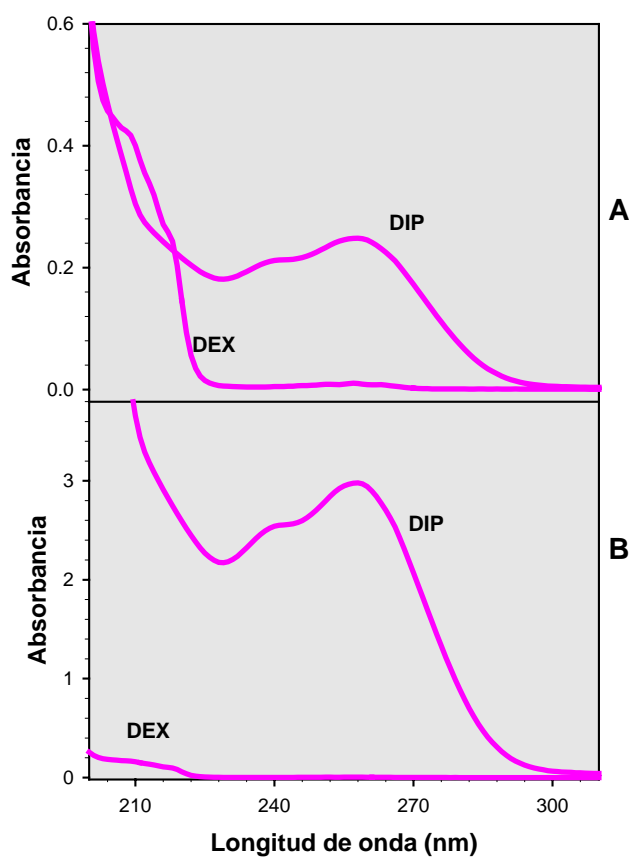


Figura 2.6A: Espectros de dextropropoxifeno (DEX) y dipirona (DIP) en solución acuosa a pH 2.0 (ambos a  $10 \text{ mg l}^{-1}$ ). B: Espectros de dextropropoxifeno (DEX) y dipirona (DIP) en concentraciones iguales a las obtenidas por dilución 1/2500 de la muestra: DEX,  $4 \text{ mg l}^{-1}$ , y DIP,  $120 \text{ mg l}^{-1}$

Como puede verse, el componente mayor (dipirona) alcanza un nivel de concentración que se desvía de la ley de Beer (rango de absorbancia entre 2 y 3), mientras que la concentración del analito menor (dextropropoxifeno) es cercana al nivel de ruido (absorbancias por debajo de 0.05). Por lo tanto, para poder obtener una sensibilidad razonable para el componente menor, es necesario trabajar con una concentración muy alta del componente mayor.

Esto conduce, en principio, a desviaciones en la linealidad de la relación señal/concentración para el analito mayor, pero también puede introducir no linealidades en el componente menor, en el caso de que ocurran interacciones químicas entre él y el más concentrado.

En primer lugar, se realizó un análisis de los datos espectrales obtenidos mediante aplicación del método PLS-1. Se determinó la región espectral óptima de trabajo por aplicación de la estrategia de ventana móvil ya descrita. Es decir, se encontró la zona del espectro con la máxima información y la mínima variancia de calibración (Collado, 2000) y se verificó que la región seleccionada coincidiera con la localización de los picos espectrales, con mínimo solapamiento.

Posteriormente, se seleccionó el número óptimo de factores, aplicando el procedimiento de validación cruzada y usando el criterio de Haaland y Thomas (Haaland, 1988). El número óptimo de factores puede observarse en la Tabla 2.13, junto a la región espectral de trabajo y parámetros estadísticos indicadores de la calidad del ajuste.

En una siguiente etapa, 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. En las Tablas 2.15 y 2.16, se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 2.13: Datos correspondientes a la calibración del modelo PLS-1

	Dipirona	Dextropropoxifeno
Región (nm)	205 – 350	214 – 231
Factores	4	4
<i>RMSECV</i> (mg l <sup>-1</sup> )	2.22	0.31
<i>RMSEP</i> (mg l <sup>-1</sup> )	3.67	0.18

Como puede observarse, los parámetros de calibración son razonablemente buenos para ambos analitos, pero es necesario trabajar con cuatro factores, dos más de lo esperado teóricamente (dos factores). Esto puede estar causado por las no linealidades, las que son tenidas en cuenta en el modelo por inclusión de factores adicionales.

Como ya se vio con anterioridad, el modelo de calibración PLS permite estudiar componentes cuyo comportamiento se desvíe ligeramente de la linealidad, introduciendo más factores en el análisis (Centner, 1998; Gemperline, 1991; Sekulic, 1993). Pero, cuando la no linealidad es significativa, los errores de predicción se vuelven importantes y se hace necesario recurrir a modelos más adecuados. Para detectar la presencia de no linealidades, varias herramientas han sido descritas en la literatura científica (Centner, 1998; Despaigne, 1998; Hadjiiski, 1999). En el presente trabajo, se recurrió a una de las herramientas más simples, construir una gráfica de concentraciones adicionadas vs. predichas y hacer un análisis de los residuos obtenidos. La Figura 2.7 muestra esta gráfica construida, pudiéndose observar en la misma que las predicciones del modelo PLS lineal para dipirona presentan una fuerte desviación de la linealidad.

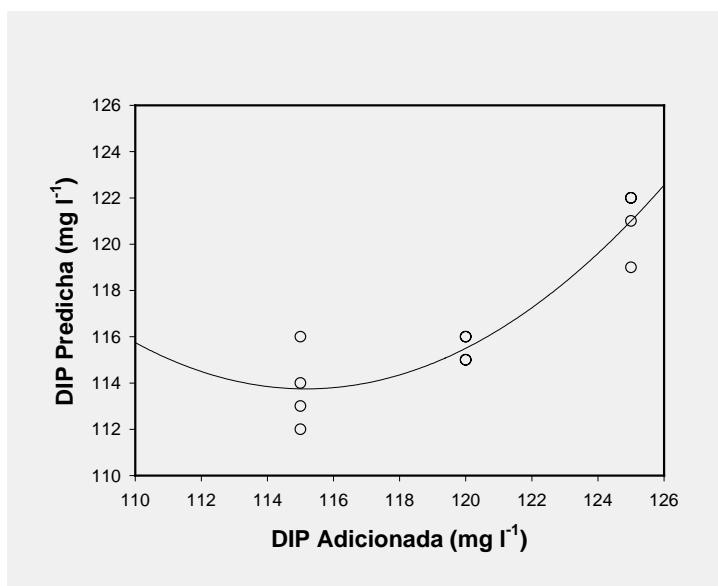


Figura 2.7: Gráfica de concentraciones adicionadas vs. predichas obtenidas por PLS-1 para dipirona en el juego de muestras de validación

Para resolver este problema, los datos espectrales obtenidos se trataron con dos modelos no lineales de PLS y con redes neuronales artificiales. Se aplicó NL-PLS (Wold, 1989) y SPL-PLS (Wold, 1992). Las predicciones obtenidas con estos modelos para las muestras del juego de validación y para las muestras reales, se presentan en las Tablas 2.15 y 2.16.

Las redes neuronales son métodos de calibración especialmente creados para modelar información no lineal, sin embargo se pueden usar también en casos donde la relación es lineal, y pueden llegar a mejorar los resultados obtenidos con los modelos lineales.

En el presente trabajo se utilizó una ANN construida con un diseño de tres capas de neuronas o nodos, como unidades básicas de cómputo:

- a- Capa de entrada con un número de neuronas activas correspondiente a las variables de predicción en la regresión.
- b- Capa escondida.
- c- Capa de salida con una sola neurona.

Se trabajó con una red donde las neuronas están conectadas de manera jerárquica, es decir las salidas de una capa se usan como entradas de la capa siguiente y el número de neuronas de la capa de entrada y de la capa escondida se optimizó durante el entrenamiento de la red.

En la capa escondida se usó la función sigmoidea  $f(x) = 1/(1 + e^{-x})$  y la salida de la neurona escondida  $j$ ,  $O_j$ , se calculó como:

$$O_j = f \left[ \sum_{i=1}^{nd} (x_i w_{ij} + \theta') \right] \quad (2.3)$$

Donde  $x_i$  es la entrada a la neurona  $j$  de la capa escondida, desde la neurona  $i$  de la capa anterior,  $w_{ij}$  son los pesos de conexión entre las neuronas  $i$  y  $j$ ,  $\theta'$  es el bias para la neurona  $j$  y  $nd$  es el número total de neuronas de la capa anterior.

En las capas de entrada y de salida se usaron funciones lineales.

En la red neuronal utilizada, el aprendizaje o entrenamiento se realiza mediante un procedimiento iterativo de retroalimentación (Zupan, 1999; Werbos, 1982), no siendo necesario especificar la forma de la función analítica de calibración y el número de parámetros del modelo.

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.

El número de neuronas de las capas de entrada y de la capa escondida se optimizó mediante prueba y error y se aplicó análisis de componentes principales (PCA) a los datos originales para ajustar el número de neuronas con los correspondientes scores.

La arquitectura seleccionada finalmente para ambos componentes se muestra en la Tabla 2.14, donde los números entre paréntesis indican las neuronas empleadas en cada capa. 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.



Tabla 2.14: Datos correspondientes a la calibración de ANN

	Dipirona	Dextropropoxifeno
Región (nm)	205 – 310	214 – 231
Modelo ANN	(3, 4, 1)	(5, 3, 1)
<i>RMSETrain</i> (mg l <sup>-1</sup> )	2.93	0.28
<i>RMSEP</i> (mg l <sup>-1</sup> )	1.5	0.10

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. Se buscó el valor mínimo para el error de predicción (*RMSEMonit*) y por ejemplo, para la dipirona, se encontró un punto de corte en 40 iteraciones. Este punto de corte corresponde a un error para la calibración de *RMSETrain* = 2.93 mg l<sup>-1</sup> y un error en la predicción del juego de muestras de monitoreo de *RMSEMonit* = 2.80 mg l<sup>-1</sup>.

En la Figura 2.8 se observa la evolución de los errores y el punto de corte encontrado.

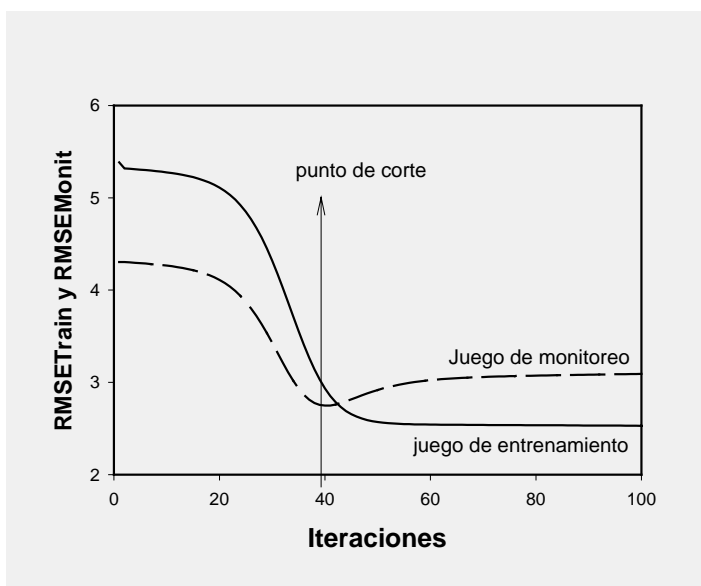


Figura 2.8: Evolución de los errores de calibración y monitoreo en función del número de iteraciones

Por otra parte, es importante considerar el hecho de que la ANN no debe ser sobre-entrenada y para esto se debe tener en cuenta que el número de objetos debe exceder al de los pesos ajustables.

En las Tablas 2.15 y 2.16, se muestran los resultados obtenidos para el juego de 12 muestras de validación y para la muestra comercial marca Klosidol, con los modelos PLS-1, NL-PLS, SPL-PLS y ANN, para dipirona y dextropropoxifeno respectivamente.

Tabla 2.15: Resultados obtenidos para dipirona por aplicación de PLS-1, NL-PLS, SPL-PLS y ANNs al juego de muestras de validación y a muestras comerciales

Muestra de validación	Concentración adicionada (mg l <sup>-1</sup> )	Concentración predicha (mg l <sup>-1</sup> )			
		PLS-1	NL-PLS	SPL-PLS	ANNs
1	115.0	113.5	118.8	119.3	117.6
2	125.0	121.7	121.6	124.0	124.0
3	115.0	113.5	118.7	119.0	117.2
4	125.0	121.5	121.8	124.8	124.6
5	115.0	115.5	118.7	118.9	117.2
6	125.0	119.8	121.9	123.8	124.2
7	115.0	112.3	118.8	119.3	116.9
8	125.0	120.7	121.1	123.7	123.3
9	120.0	116.0	121.9	121.9	121.0
10	120.0	115.9	122.1	122.1	121.0
11	120.0	115.9	121.6	121.9	120.6
12	120.0	115.8	121.1	121.7	119.6
RMSEP	-	3.7	3.1	2.7	1.5
Klosidol <sup>a</sup>	120.0	107.0 (0.9)	113.8 (1)	118.6 (0.1)	121.6 (0.6)

<sup>a</sup> Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar para cuatro replicados.

Valor de referencia (método UV) = 126.0 (0.4) mg l<sup>-1</sup> (cuatro replicados).

Tabla 2.16: Resultados obtenidos para dextropropoxifeno por aplicación de PLS-1, NL-PLS, SPL-PLS y ANNs al juego de muestras de validación y a muestras comerciales

Muestra de validación	Concentración adicionada (mg l <sup>-1</sup> )	Predicha (mg l <sup>-1</sup> )			
		PLS-1	NL-PLS	SPL-PLS	ANNs
1	3.5	3.4	4.0	3.8	3.4
2	3.5	3.3	3.8	3.8	3.4
3	3.8	3.7	4.0	3.8	3.7
4	3.8	3.6	3.9	3.8	3.7
5	4.0	3.9	4.0	3.7	4.0
6	4.0	4.0	3.8	3.8	4.0
7	4.3	4.2	4.0	3.8	4.3
8	4.3	3.8	3.9	3.9	4.0
9	3.5	3.5	3.9	3.8	3.5
10	3.8	3.6	3.9	3.8	3.7
11	4.0	3.8	3.9	3.9	4.0
12	4.3	4.1	3.9	3.9	4.1
RMSEV	-	0.18	0.28	0.27	0.10
Klosido <sup>a</sup>	4.0	4.15 (0.18)	4.10 (0.20)	3.70 (0.07)	4.06 (0.08)

<sup>a</sup> Los valores entre paréntesis corresponden a desviación estándar para cuatro replicados.

Valor de referencia (método por HPLC) = 4.03 (0.03) mg l<sup>-1</sup> (cuatro replicados).

Como puede observarse, los resultados obtenidos mejoran al aplicar el análisis por los modelos no lineales de PLS y ANNs, sobre todo para la dipirona, cuya concentración se sospecha en una relación no lineal con la señal. El método SPL-PLS muestra una precisión excelente y una predicción razonablemente buena, cuando se analiza dipirona en la muestra comercial.

En la Figura 2.9 se presenta la gráfica de concentraciones predichas vs. concentraciones adicionadas, para la dipirona utilizando el método de ANNs, y como puede observarse la curvatura está significativamente disminuida.

Esto nos permite concluir que la no linealidad es considerable, especialmente para la dipirona 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.

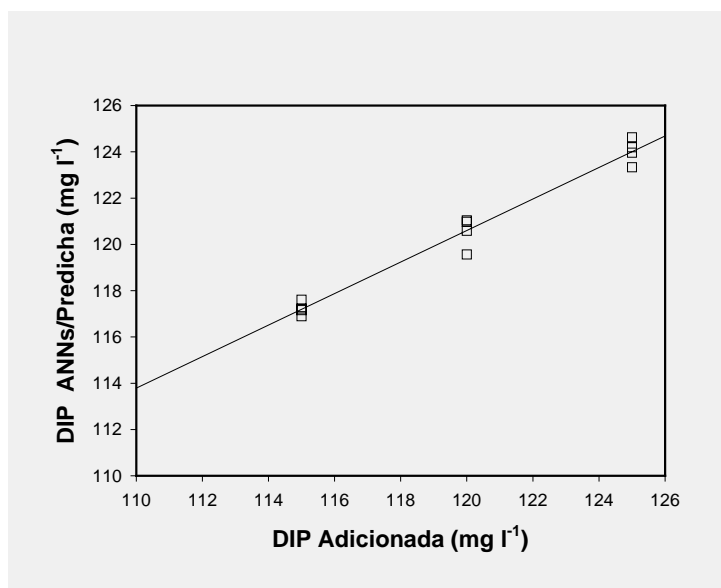


Figura 2.9: Gráfica de concentraciones adicionadas vs. predichas obtenidas por ANNs para dipirona en el juego de muestras de validación

En el caso del dextropropoxifeno, el análisis de las muestras sintéticas y comerciales con los modelos no lineales de PLS, no muestra 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.

En cambio, 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.

#### 2.2.4. CONCLUSIONES

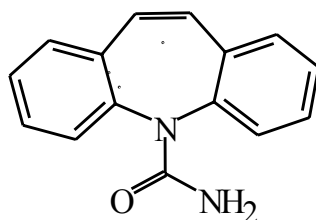
En el presente trabajo se demostró que la combinación de una espectroscopia UV con una técnica quimiométrica adecuada, constituye una estrategia analítica válida para la determinación simultánea de dos ingredientes activos, presentes en concentraciones muy diferentes en un inyectable.

A pesar de existir un alto grado de solapamiento espectral y de la ocurrencia de no linealidades, se consiguió realizar el análisis simultáneo de dipirona y dextropropoxifeno en inyectables, con exactitud y precisión razonablemente buenas. Los resultados fueron comparables con los obtenidos con los métodos utilizados para la comparación: cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectroscopia UV.

## 2.3. DETERMINACIÓN DE CARBAMAZEPINA EN MUESTRAS DE SUERO HUMANO

### 2.3.1. CARBAMAZEPINA. CARACTERÍSTICAS Y ANTECEDENTES ANALÍTICOS.

La carbamazepina (CBZ) es una droga muy utilizada para el tratamiento de la epilepsia y otros desórdenes psiquiátricos (Goodman Gilman, 2001). La misma se metaboliza completamente en el cuerpo, siendo muy pequeña la cantidad que se elimina por la orina sin modificaciones (Goodman Gilman, 2001). Generalmente la carbamazepina se usa en combinación con otras drogas antiepilépticas, tales como la fenitoína o el ácido valproico y las concentraciones en suero publicadas como terapéuticas van de 6 a 12  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . La determinación de los niveles de carbamazepina en el suero del paciente es sumamente importante para minimizar la toxicidad del tratamiento.



Esquema 2 3: Fórmula estructural de la carbamazepina

Su principal metabolito es el epóxido de carbamazepina (CBZ-EP), que también posee actividad farmacológica como anticonvulsivante (He, 1992), alcanzando niveles de concentración inferiores a los de carbamazepina.

En la literatura se han propuesto varios métodos para la determinación de carbamazepina, fundamentalmente basados en técnicas cromatográficas (Bhatti, 1998; Das-Gupta, 1999; Ashy, 1986; Raggi, 2000; Franceschi, 2005; Chelberg, 1988; Hartley, 1986). La cromatografía líquida de alta resolución y el inmunoensayo por fluorescencia polarizada (FPIA), se usan comúnmente como métodos de rutina para la determinación de CBZ y de otros anticonvulsivantes (Sánchez, 1999). También se usan otros métodos basados en técnicas como la cromatografía micelar electrocinética capilar (MECC) (Lancas, 2003) y la quimioluminiscencia (Lee, 2003). Recientemente, se ha publicado un trabajo para determinación simultánea de CBZ y fenitoína, usando espectrofotometría y calibración multivariada (Rezaei, 2005) y otro que utiliza la fluorescencia de la CBZ sobre una membrana de nylon, con tratamiento de los datos de segundo orden (excitación-emisión) con el modelo PARAFAC (Escandar, 2004).

### 2.3.2. MÉTODO ANALÍTICO

En el presente trabajo se desarrolló un método analítico para la determinación de carbamazepina en muestras de sueros de pacientes, basado en la combinación de una espectroscopia de absorción ultravioleta, posterior a una extracción con solvente orgánico, y un tratamiento de los datos obtenidos por aplicación de un método de calibración multivariada.

La determinación de carbamazepina (CBZ) en una muestra compleja como el suero humano, no es posible por espectroscopia convencional, debido al alto grado de solapamiento espectral existente y a la variabilidad intrínseca basal de los sueros. Por esta razón, la construcción de un modelo de calibración multivariada necesitaría un número muy importante de muestras de calibración para cubrir todas las fuentes de variabilidad (Goicoechea, 1999).

En el procedimiento analítico del presente trabajo se realiza un paso previo de extracción de la CBZ, para solucionar el problema de las interferencias originadas por los componentes endógenos y exógenos de los sueros. De esta manera se logra que el modelo quimiométrico necesite menor cantidad de muestras en el paso de la calibración.

La optimización de la extracción de la CBZ es un aspecto crítico, dado que es necesario alcanzar una recuperación importante. Para seleccionar las mejores condiciones en este paso, se utilizó un diseño de mezclas asociado con una metodología de superficie de respuesta (Myers, 1995).

Finalmente se realizó el tratamiento quimiométrico de los datos espectrofotométricos obtenidos, por aplicación del método PLS-1 a la segunda derivada de los espectros UV, para eliminar de esta manera un efecto de corrimiento de la línea de base originado en el paso de la extracción.

El procedimiento analítico seguido para las muestras de suero de pacientes tratados con CBZ y las preparadas artificialmente para calibración y validación, se detalla a continuación:

- e- Se mide un volumen de 500  $\mu\text{l}$  de la muestra de suero y se coloca en un tubo de vidrio con tapa, de 2 ml de capacidad.
- f- Se adiciona un volumen de 500  $\mu\text{l}$  de solvente, se agita el tubo durante 3 minutos y se centrifuga 5 minutos a 2000 rpm.
- g- Se toma una alícuota de 300  $\mu\text{l}$  de fase orgánica, se transfiere a una microcubeta y se obtienen los espectros de absorción electrónica en el rango 280-350 nm.

### 2.3.2.1. MÉTODOS DE REFERENCIA

Para la validación del método analítico desarrollado se realizaron determinaciones de CBZ por HPLC (Raggi, 2000; Franceschi, 2005; Chelberg, 1988; Hartley, 1986) y por inmunofluorescencia polarizada (FPIA) (Sánchez, 1999). Para la separación cromatográfica se trabajó a temperatura ambiente y con una fase móvil consistente en una mezcla filtrada y desgasificada de metanol, agua y acetonitrilo (25/65/10). El análisis se realizó bajo condiciones isocráticas, a una velocidad de flujo de  $1 \text{ ml min}^{-1}$  y el efluente se monitoreó mediante mediciones UV a 214 nm. Se usó estándar interno, preparado por adición de 0.30 ml de una solución de  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  de metilcarbamazepina en acetonitrilo a 0.20 ml de muestra. Todas las soluciones se filtraron antes de la inyección, usando filtros Millipore de  $0.22 \mu\text{m}$  de tamaño de poro. Las determinaciones por FPIA se realizaron en el Hospital Provincial Cullen, usando un equipo Abbott FPIA-TDx.

### 2.3.2.2. EQUIPAMIENTO

Las mediciones de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro marca: Perkin Elmer, modelo: Lambda 20, usando celdas de cuarzo de 1.00 cm de camino óptico, 2 nm de ancho de banda, una velocidad de escaneo de  $860 \text{ nm min}^{-1}$  y registrando cada 1 nm. Los espectros UV de las soluciones de trabajo se registraron en el rango 280-350 nm, fueron convertidos a formato ASCII y se transfirieron a una PC Athlon 2.2, para su tratamiento posterior. El método PLS-1 se aplicó utilizando la herramienta MVC1 del programa MATLAB (Olivieri, 2004), que representa una versión mejorada del programa MULTIVAR ya presentado. Los espectros derivados se obtuvieron aplicando el filtro Savitzky-Golay, usando un polinomio de segundo orden y una ventana de 11 puntos.

Para diseño experimental y optimización se utilizó el programa Design\_Expert 6.0.10. Las determinaciones por HPLC se realizaron en un cromatógrafo Lachrom-Hitachi equipado con detector UV L 7400, una pre-columna de  $5 \mu\text{m}$  LiChrocart® 4-4, RP-18 y una columna de  $5 \mu\text{m}$  LiChrocart® 125-4, RP-18.

### Programa MVC1

En la Figura 2.10 se observa la pantalla del programa. La misma está dividida en dos regiones verticales, cuyas funciones se describen a continuación:

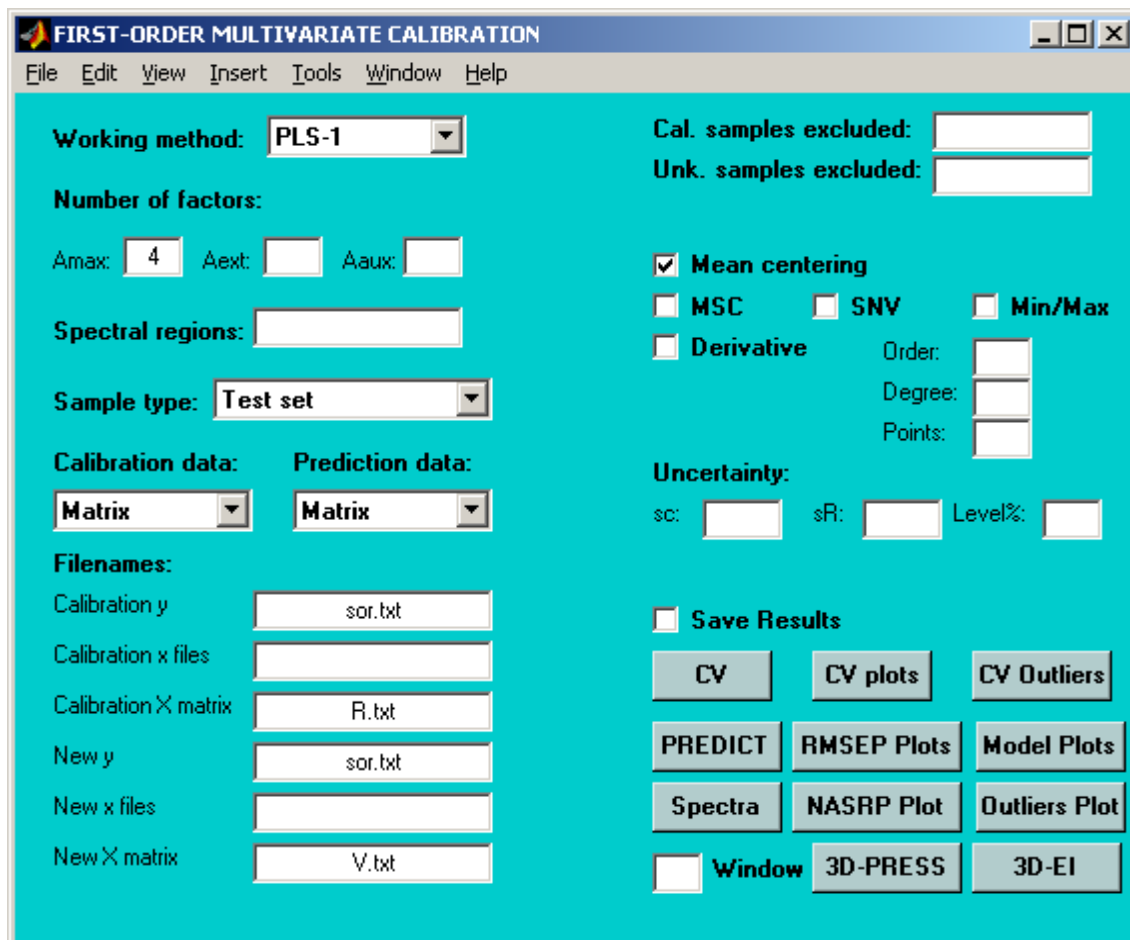


Figura 2.10: Pantalla del programa MVC1.

### Funciones:

1. Columna izquierda: ingreso de datos y selección de las condiciones de trabajo.

- 1) Selección del método (*working method*): permite seleccionar el método multivariado de trabajo (PCR, PLS-1, HLA/GO, HLA/XS, etc.).
- 2) Número de factores (*number of factors*): consta de tres ventanas. En la primera ventana, según el criterio de Haaland y Thomas, se ingresa la mitad del número de mezclas de calibración más uno, y se realiza la validación cruzada. Una vez obtenido el número óptimo de factores, se ingresa este valor para realizar la predicción. La segunda y tercer ventana se utilizan en métodos que requieren de más de un factor, como los basados en corrección ortogonal de la señal (OSC).



- 3) Región espectral (*spectral regions*): permite seleccionar la región de longitudes de onda de trabajo. En caso de dejar el espacio en blanco el programa realiza los cálculos con todos los datos del espectro.
- 4) Tipo de muestra (*sample type*): presenta dos opciones de trabajo: a) juego de validación (*test set*) o b) (*unknowns*) para muestras desconocidas.
- 5) Datos de calibración (*calibration data*) y datos de predicción (*prediction data*): estas dos ventanas presentan tres opciones: a) *x\_vectors*, b) *x, y\_vectors*, o c) *matrix*. Se selecciona una, de acuerdo al tipo de arreglo que tengan los datos.
- 6) Nombre de los archivos de datos (*filenames*): consta de una columna de siete ventanas donde se ingresan los nombres de los archivos de datos.
  - Calibration y: vector de datos (concentraciones del juego de calibración)
  - Calibration x vectors: vector de datos (señales de calibración)
  - Calibration X matrix: matriz de datos (señales del juego de calibración)
  - Unknown y: vector de datos (concentraciones de la muestra)
  - Unknown x vectors: vector de datos (señales de la muestra)
  - Unknown X matrix: matriz de datos (señales de las muestras)
  - Single unknown x: vector de datos (señal de una muestra)

## 2. Columna derecha: funciones que realiza el programa.

- 1) Exclusión de muestras de calibración (*Cal. samples excluded*): permite excluir muestras anómalas (*outliers*) del juego de calibración, y trabajar con las restantes. En la ventana se coloca el número correspondiente de la muestra a excluir.
- 2) Muestras de validación excluidas (*Unk. samples excluded*): permite excluir muestras anómalas (*outliers*) del juego de validación, y trabajar con las restantes. En la ventana se coloca el número correspondiente de la muestra a excluir.
- 3) Métodos de preprocesamiento de datos, que consta de cinco ventanas. Se proponen varias opciones, en algunos casos permiten eliminar el ruido o en otros darles el mismo peso a todas las variables. Estas ventanas son:
  - a) Centrado de los datos (*Mean centering*): se activa por defecto.
  - b) *Multiplicative scatter correction (MSC)*.
  - c) *Different variations of estándar normal variate (SNV)*.

- d) Escalado (*Min/Max*).
- e) Derivada de la señal (*derivate*): para esta opción existen tres ventanas, donde se puede ingresar el orden de la derivada (*order*), el grado del polinomio de Savitzky-Golay (*degree*), y el número de puntos a usar en el suavizado (*points*).
- 4) Errores (*uncertainly*): consta de tres ventanas, *sc*, *sR* y *level %*, correspondientes a la estimación de errores en concentración y en señal. Estos datos son utilizados para el cálculo de cifras de mérito.
- 5) Guardar resultados (*save results*): consta de una ventana que permite la opción de archivar los resultados. Se crean archivos en el directorio en el que se está trabajando.
- 6) Validación cruzada (Tecla *CV*): al apretar esta tecla el programa realiza los cálculos de la validación cruzada. Los resultados se informan en la pantalla del programa MATLAB.
- 7) Gráficos de la validación cruzada (Tecla *CV plots*): mediante esta tecla se pueden visualizar los gráficos de la validación cruzada en una pantalla que se abre automáticamente: 1) *PRESS vs. A*, 2) *log(PRESS) vs. A*, 3) *SEP vs. A*, 4) *log(SEP) vs. A*.
- 8) Muestras anómalas del juego de calibración (Tecla *CV outliers*): al apretar esta tecla en una nueva pantalla el programa pide que se ingrese el número de factores de calibración (*set number factor*). Una vez ingresado este número se presiona *GO* y el programa grafica (abriendo otra pantalla): *Nº de mezcla vs. Fpract/ Fcrit (sample vs. Fpract/ Fcrit)*.
- 9) Predicción (Tecla *PREDICT*): al presionar esta tecla el programa realiza la predicción de las muestras desconocidas, el resultado se informa en la pantalla del programa MATLAB.
- 10) Estadísticos de la predicción (Tecla *RMSEP Plots*): al presionar esta tecla se abre una pantalla en la que el programa grafica algunos estadísticos de la predicción: 1) *Error vs. Número de factores (RMS vs. A)*, 2) *Resultados predichos vs. Concentraciones nominales (Predicted vs. Actual)*, 3) *Residuos vs. Muestra (Residuals: Residuals vs. Sample)*, 4) *Intervalo elíptico conjunto para la pendiente y la ordenada al origen de la regresión del punto 2 [EJCR (Elliptical joint confidence regions): Intecept vs. Slope]*.
- 11) Gráficos del modelo (Tecla *Model plots*): al presionar esta tecla en una nueva pantalla el programa realiza los siguientes gráficos: 1) *Sensibilidad vs. Número de factores (Sensitivity vs. A)*, 2) *Coefficientes de regresión (Regresión coefficients: bk vs. Sensor)*, 3) *Selectividad vs. Número de factores (Selectivity vs. A)*, y 4) *Señal neta (Net sensitivity: sk vs. Sensor)*.

- 12) Gráficos de los espectros (Tecla *Spectral plots*): apretando esta tecla se obtienen, en una nueva pantalla, los siguientes gráficos: 1) Gráfico de los espectros de calibración vs. Sensores (*Raw calibration*), 2) Gráfico de los espectros de las muestras desconocidas vs. Sensores (*Raw unknowns*) 3) y 4) Espectros de calibración y de predicción preprocesados según opciones ya descritas vs. sensores (*Preprocessed calibration* y *Preprocessed unknowns*).
- 13) Gráficos de regresión de la NAS (Tecla *NASRP Plots*): al presionar esta tecla el programa abre una pantalla en la que pide que se ingrese el número de la muestra con la que se desea realizar los gráficos. A continuación se aprieta la tecla GO, y el programa abre una pantalla con los siguientes gráficos: 1)  $r_e^*$  y  $s_e^*$  vs. Sensores ( $r_k^*$  and  $s_k^*$  vs. *Sensor*), 2) NASRP ( $r_k^*$  vs.  $s_k^*$ ), 3) y 4) Residuos vs. Sensores (*Net residual* vs. *Sensor* y *Residual* vs *sensor*).
- 14) Muestras anómalas de la predicción (Tecla *Outliers Plots*): al presionar esta tecla el programa abre una pantalla con el gráfico: Muestra vs.  $F_{pract}/F_{crit}$ . (*sample number* vs. *Fpract/Fcrit*)
- 15) Gráficos del PRESS y del Error indicador en función del primer sensor y de la ventana móvil (Teclas *3D-PRESS* y *3D-EI*). Junto a estas teclas aparece una ventana donde debe ingresarse el número de sensores con el que se realiza el cálculo. El programa informa los resultados numéricos en la pantalla MATLAB, y además abre una ventana en cada caso, con un gráfico 3D y un diagrama de contorno.

### 2.3.2.3. REACTIVOS

Los reactivos necesarios para realizar el procedimiento analítico, se prepararon a partir de drogas calidad para análisis y de acuerdo a lo que se detalla a continuación:

- g) Solución *stock* de carbamazepina (CBZ): se disolvió la droga sólida en metanol, de manera de lograr una concentración de  $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ .
- h) Solución *stock* de epóxido de carbamazepina (CBZ-EP): se disolvió la droga sólida en metanol, de manera de lograr una concentración de  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

Se trabajó además con sueros de pacientes tratados con carbamazepina y sueros de personas sanas.

### 2.3.2.4. OPTIMIZACIÓN

En una primera etapa, se analizó la extracción del analito estudiado desde el suero humano usando tres solventes diferentes, elegidos sobre la base de resultados publicados (Escandar, 2004). Para realizar la

optimización experimental del paso de extracción, se utilizó un diseño de mezclas *simplex centroide* aumentado con experimentos axiales. Se realizaron 15 experimentos para probar tres solventes puros y combinaciones de dos o tres de ellos. La Tabla 2.17 muestra este diseño y los valores de recuperación obtenidos en cada experimento.

Tabla 2.17: Diseño experimental usado para la optimización del paso de extracción

Experimento	Benceno (%)	Tolueno (%)	1-Pentanol (%)	Recuperación (%)
1	0.0	50.0	50.0	48.0
2	0.0	0.0	100.0	12.0
3	0.0	0.0	100.0	13.0
4	50.0	50.0	0.0	93.6
5	50.0	50.0	0.0	91.8
6	50.0	0.0	50.0	38.0
7	0.0	100.0	0.0	89.9
8	66.7	16.7	16.7	75.8
9	100.0	0.0	0.0	103.0
10	0.0	100.0	0.0	87.5
11	16.7	16.7	66.7	34.9
12	0.0	50.0	50.0	46.0
13	100.0	0.0	0.0	108.0
14	16.67	66.67	16.7	66.5
15	33.3	33.3	33.3	70.0

Como ya se vio, en este tipo de diseño experimental los factores son los componentes de la mezcla y la respuesta es una función de la proporción de cada componente (Myers, 1995). El diseño *simplex centroide* comprende  $(2^q-1)$  experimentos, donde  $q$  es el número de factores a ser analizados. En este caso  $q = 3$ , por lo tanto el número de experimentos es 7. Este diseño se aumentó con 3 experimentos axiales y se realizaron además 5 replicados, dando lugar a un total de 15 experimentos.

Este diseño permitió obtener una superficie de respuesta, por ajuste de los datos al modelo polinomial siguiente representado por la ecuación 2.4:

$$y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_1 x_2 + \beta_5 x_1 x_3 + \beta_6 x_2 x_3 + \varepsilon \quad (2.4)$$

Donde  $x_i$  son los factores analizados ( $x_1 =$  benceno,  $x_2 =$  tolueno,  $x_3 =$  1-pentanol) y  $\beta_i$  son los coeficientes de regresión.

Siguiendo el procedimiento analítico anteriormente especificado, se realizó la extracción de una muestra de suero adicionado con CBZ, se transfirió la fase orgánica a una cubeta de lectura y se obtuvo el espectro UV usando como blanco el correspondiente solvente (o mezcla). Este procedimiento se repitió para cada uno de los 15 experimentos. La lectura de absorbancia obtenida a 290 nm se comparó con la correspondiente a una solución patrón preparada con el mismo solvente (o mezcla) usado en la extracción. Esta lectura de absorbancia se consideró como el 100 % y a partir de los datos obtenidos se calculó la recuperación. Los parámetros obtenidos después del ajuste fueron:

$$y = 1.05 x_1 + 0.87 x_2 + 0.13 x_3 - 0.12 x_1 x_2 - 0.66 x_1 x_3 - 0.07 x_2 x_3 \quad (2.5)$$

Los valores de las variables correspondientes a la máxima respuesta (recuperación = 104.9 %) fueron: Benceno = 100 %, tolueno = 0 % y 1-pentanol = 0 %. En la Figura 2.11 se muestra la superficie de respuesta obtenida y en Figura 2.12 la gráfica de contornos correspondiente.

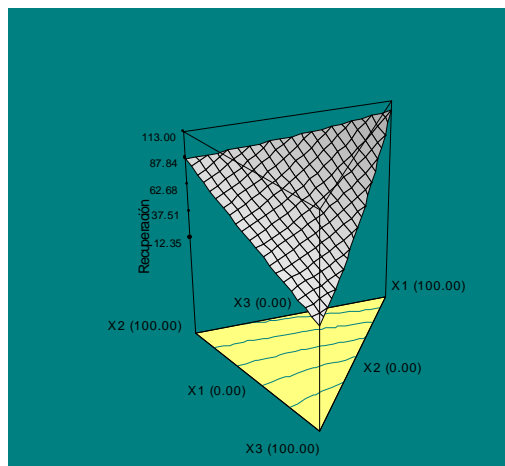


Figura 2.11: Superficie de respuesta para el modelo cuadrático de Scheffé

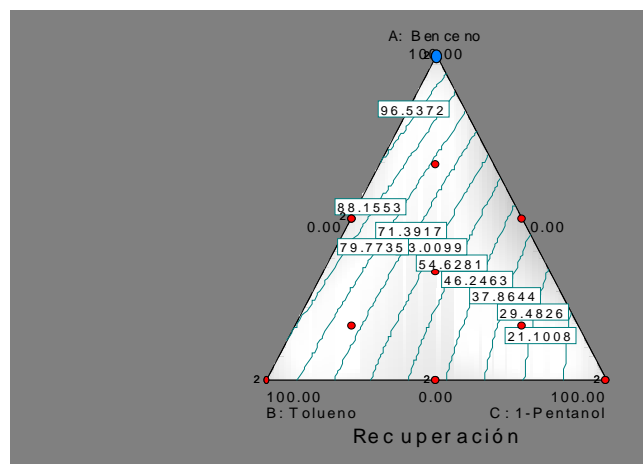


Figura 2.12: Gráfica de contornos para el diseño de mezclas *simplex centroide*

### 2.3.2.5. DISEÑO DEL JUEGO DE MUESTRAS DE 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. Se obtuvieron de esta manera niveles de concentración dentro de un rango de 0 a 14.0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para CBZ y de 0 a 4.2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para CBZ-EP. La Figura 2.11 muestra las concentraciones de los analitos para este juego.

El CBZ-EP fue tenido en cuenta en la preparación del juego de muestras de calibración ya que es el principal metabolito de la CBZ y está siempre presente en el suero del paciente tratado, siendo además extraído junto con la CBZ. El intervalo de concentraciones seleccionado para la CBZ es levemente más amplio que el rango terapéutico (4.0-12.0  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) (Goodman Gilman, 2001) y previamente se verificó la linealidad de la respuesta dentro del mismo.

### 2.3.2.6. DISEÑO DE LOS JUEGOS DE MUESTRAS DE VALIDACIÓN

Se prepararon tres juegos de muestras para validación:

- 1- Juego N° 1: se preparó de la misma manera que el juego de muestras de calibración, pero con concentraciones diferentes a las indicadas para este último. En la Figura 2.13 se pueden ver las concentraciones de los analitos para este juego.
- 2- Juego N° 2: se prepararon tres muestras a partir de tres mezclas diferentes de sueros de personas sanas, adicionados con diferentes volúmenes de la solución *stock* de CBZ, de manera de tener las siguientes concentraciones: 3.0, 9.9 y 13.8  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Este juego se usó para el estudio de precisión.
- 3- Juego N° 3: se prepararon cuatro muestras a partir de cuatro mezclas diferentes de sueros de personas sanas, adicionados con diferentes volúmenes de la solución *stock* de CBZ, de manera de tener concentraciones dentro del rango 3.0-14.3  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Este juego se usó para realizar un estudio de recuperación.

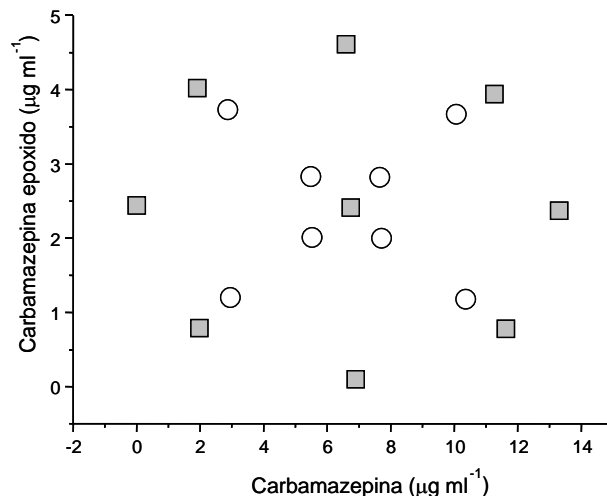


Figura 2.13: Diseño experimental para el juego de muestras de calibración (cuadrados) y para el juego N° 1 de validación (círculos).

### 2.3.3. RESULTADOS

En la Figura 2.14 se pueden observar varios espectros de sueros humanos de personas sanas y de soluciones acuosas de CBZ y de CBZ-EP, ambos en una concentración de 10 µg ml<sup>-1</sup>. Como puede apreciarse, el sistema presenta un fuerte grado de solapamiento espectral, complejidad que se suma a la considerable variabilidad basal intrínseca de los sueros.

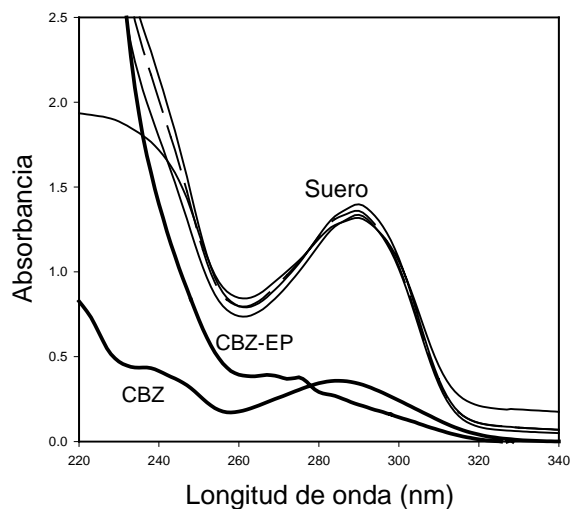


Figura 2.14: Espectros de sueros humanos y de soluciones acuosas de CBZ y de CBZ-EP

Para realizar la determinación de la CBZ en este complejo sistema analítico, 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. 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. Como puede verse en la Tabla 2.18, el número de variables latentes para el caso de los espectros de orden cero es igual a tres, siendo esto indicativo de las fuentes de variabilidad en este sistema. Por otra parte, cuando se trabaja con la segunda derivada de los datos espectrales, el número de factores decrece a dos, ya que se elimina el problema del corrimiento de la línea de base. Esto sugiere entonces, que la tercer fuente de variabilidad encontrada al analizar los espectros de orden cero corresponde a este fenómeno y que el mismo se corrige usando la señal derivada. En la Figura 2.15A se muestran los espectros de calibración de orden cero y en la Figura 2.15B los espectros de calibración correspondientes a la segunda derivada.

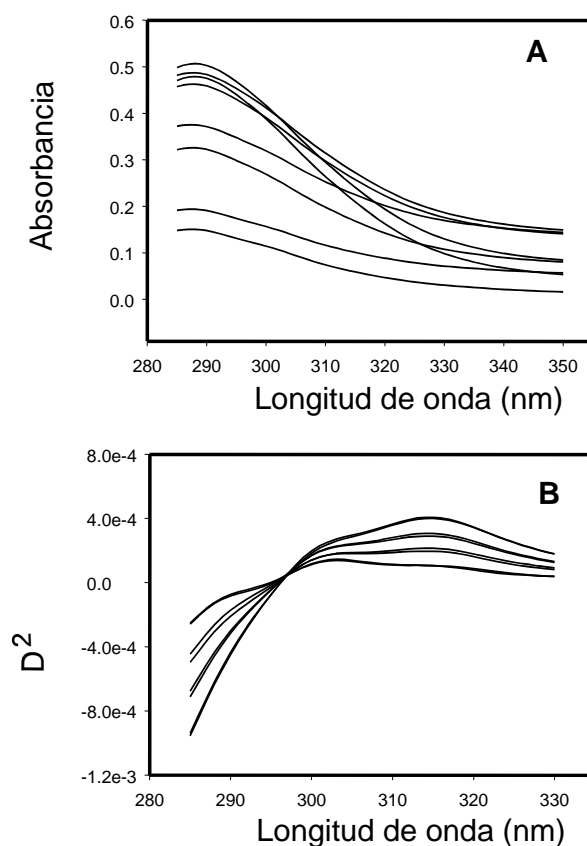


Figura 2.15: (A) Espectros de calibración de orden cero. (B) Espectros de calibración correspondientes a la segunda derivada.



En la Tabla 2.18 se presentan además otros parámetros estadísticos importantes y las cifras de mérito para el modelo de calibración multivariada aplicado a los dos tipos de espectros.

Tabla 2.18: Región espectral, número de factores y parámetros estadísticos correspondientes a ambos modelos PLS-1

Parámetros estadísticos	Datos espectrales de orden cero	Datos de la segunda derivada de los espectros
Región (nm)	285–350	285–350
Factores	3	2
<i>RMSECV</i> ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	0.34	0.24
<i>REP</i> (%)	5.00	3.90
SEN	0.13	0.00043
SEL	0.73	1.00
$\gamma^{-1}$ ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	0.08	0.12
<i>LOD</i> ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	0.25	0.40
<i>LOQ</i> ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	0.77	1.21

Los resultados obtenidos con estos modelos, en la predicción de la concentración de CBZ en las muestras del juego de validación número uno, se presentan en la Tabla 2.19.

Tabla 2.19: Resultados obtenidos por aplicación de ambos modelos de PLS-1 al juego de validación N° 1

Muestra de validación	CBZ adicionada ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Espectro de orden cero		Segunda derivada	
		CBZ encontrada ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Recuperación (%)	CBZ encontrada ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Recuperación (%)
1	2.87	1.91	66.41	2.75	95.84
2	2.95	2.24	75.78	2.71	91.75
3	10.06	9.68	96.19	10.36	102.97
4	10.36	9.78	94.44	10.15	97.93
5	5.48	5.17	94.39	5.42	98.99
6	5.52	5.21	94.36	4.87	88.21
7	7.66	8.01	104.55	7.74	101.05
8	7.71	7.54	97.80	7.38	95.76
Recup. media			90.49		96.56
<i>REP</i> (%)			8.64		5.35

Para analizar la precisión del método analítico desarrollado, se trabajó sobre el juego de muestras de validación número dos. Se analizó la repetibilidad del ensayo, mediante la realización de cinco replicados, para cada uno de los niveles de concentración estudiados y se obtuvieron los resultados que se presentan en la Tabla 2.20.

Tabla 2.20: Resultados del estudio de precisión

	Concentración adicionada ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Concentración predicha ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
Nivel 1	3.0	3.2	0.083	2.6
Nivel 2	9.9	9.4	0.17	1.8
Nivel 3	13.8	13.7	0.17	1.2

Para el análisis de la exactitud se calcularon los porcentajes de recuperación en las muestras adicionadas con CBZ, correspondientes al juego de validación número 3. Para cada nivel de concentración se realizaron triplicados y los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2.21. Como puede verse los porcentajes de recuperación obtenidos son cercanos al 100 % para todos los niveles analizados. Por otra parte, se realizó una prueba *t-student* para comparar el valor medio de CBZ encontrado con la concentración adicionada.

Tabla 2.21: Resultados obtenidos para el estudio de recuperación realizado con el juego de validación número 3.

	Concentración carbamazepina ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )							
	Nivel 1		Nivel 2		Nivel 3		Nivel 4	
	Adicionada	Encontrada	Adicionada	Encontrada	Adicionada	Encontrada	Adicionada	Encontrada
Replicado 1	2.97	2.88	8.74	8.65	11.54	11.10	14.28	13.73
Replicado 2	2.97	3.03	8.74	8.78	11.54	11.28	14.28	14.25
Replicado 3	2.97	2.97	8.74	8.48	11.54	11.48	14.28	14.11
Promedio		2.96		8.64		11.29		14.03
Desviación estándar		0.08		0.15		0.14		0.27
Probabilidad <i>t</i> de student (p) <sup>a</sup>		0.829		0.300		0.080		0.183
Recuperación promedio		99.7		101.7		98.0		98.3

<sup>a</sup> DENS: Diferencia estadísticamente no significativa.

Con los datos de esta experiencia, se construyó una gráfica de concentraciones adicionadas vs. concentraciones predichas, usando para el ajuste regresión lineal ordinaria (González, 1999) 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). En la Figura 2.16 se puede ver el gráfico correspondiente a esta región.

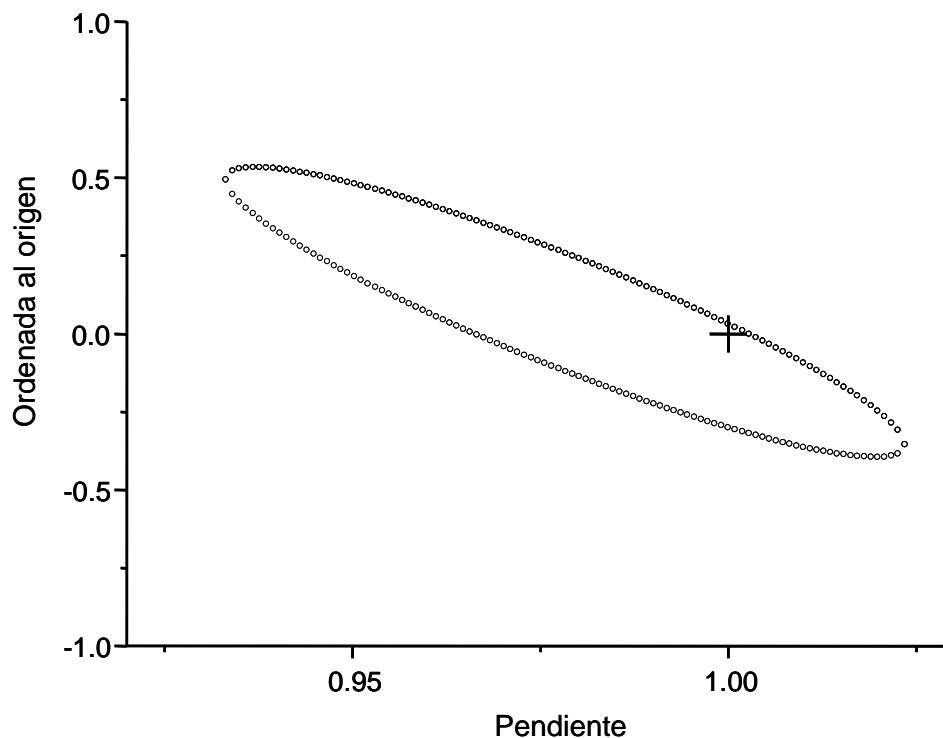


Figura 2.16: Región elíptica de confianza conjunta para la pendiente ( $b$ ) y para la ordenada al origen ( $a$ ), correspondiente al análisis por regresión de las concentraciones adicionadas vs. las concentraciones predichas de CBZ. La marca en forma de cruz corresponde al punto teórico ( $a = 0$ ,  $b = 1$ ).

Finalmente, se realizó una comparación de los resultados obtenidos con el método analítico desarrollado y los obtenidos por aplicación de dos métodos de referencia: HPLC y FPIA. Para esto se trabajó con un juego de 10 muestras de sueros de pacientes tratados con CBZ, las que fueron analizadas en paralelo. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2.22.

Tabla 2.22: Estudio comparativo de los resultados obtenidos por aplicación de HPLC o FPIA y PLS-1 sobre muestras reales de pacientes

Muestra	Carbamazepina predicha ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )		
	HPLC	FPIA	Método desarrollado
Paciente 1	4.67	–	4.65
Paciente 2 <sup>a</sup>	6.02	6.18	6.34
Paciente 3	9.12	9.34	9.66
Paciente 4	3.70	3.88	4.06
Paciente 5	6.92	–	6.12
Paciente 6	8.32	8.52	8.86
Paciente 7	4.88	4.93	4.82
Paciente 8	7.41	7.60	8.56
Paciente 9	6.40	6.56	6.48
Paciente 10	8.37	8.54	8.14

<sup>a</sup> Se determinó que el valor de la fenitoína era  $10.0 \mu\text{g ml}^{-1}$  por aplicación del método FPIA.

#### 2.3.4. DISCUSIÓN

Durante la optimización del paso de extracción, se determinó que el solvente más conveniente era el benceno. Como se sabe, el benceno es un solvente altamente tóxico, pero dado que se trabaja con volúmenes muy pequeños del mismo, se puede considerar que este aspecto se ve minimizado.

Como puede verse en las Tablas 2.18 y 2.19, 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. Por otra parte, se observa también que al trabajar con el espectro derivado hay una pérdida en la sensibilidad y consecuentemente un aumento en los límites de detección y cuantificación. En cambio, la selectividad se ve incrementada, y esto se puede entender si se observa la Figura 2.15. Aquí se ve que pequeñas diferencias entre los espectros están magnificadas, obteniéndose de esta manera mayor información de los datos espectrales.

Si se analizan los resultados obtenidos en el estudio de la precisión, se ve que la misma mejora cuando aumenta la concentración de la CBZ, pero en todos los niveles estudiados resulta comparable con las

de los métodos de referencia. Por otra parte, a partir de los resultados del experimento de recuperación se determinó que no hay evidencia de error sistemático, mientras que en la comparación con los métodos de HPLC y FPIA se obtuvo una buena concordancia entre los valores de concentración predichos con el presente método, para las muestras de pacientes analizadas y los obtenidos con los métodos de referencia. Para casi todas las muestras, se tiene un error relativo comprendido en el rango de 0.4 a 6 % (sólo la muestra n° 8 presenta un error relativo de 15.5 %). La muestra n° 2 contiene también fenitoína (10 mg ml<sup>-1</sup>, determinada por FPIA) y el resultado obtenido para la CBZ con el presente método, no difiere significativamente del obtenido con los métodos de referencia. Este hecho, sumado a la ausencia de absorbancia para el ácido valproico en la región espectral estudiada, permite concluir que las otras drogas antiepilépticas usadas comúnmente en combinación con la CBZ, no resultan interferentes cuando se aplica esta metodología.

Finalmente, también es importante señalar que una vez realizada la calibración, las mediciones de las muestras pueden ser hechas en unos pocos minutos, presentando beneficios tanto en términos económicos como en la reducción de tiempos de implementación, sobre los otros métodos convencionales.

### 2.3.5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se demuestra que la combinación de una espectrofotometría UV acoplada con una extracción optimizada del analito y un método de calibración multivariada (PLS-1), constituye una herramienta poderosa para ser aplicada al monitoreo de drogas terapéuticas. Mediante la aplicación del método desarrollado en muestras reales de pacientes, se determinó la concentración de CBZ de manera exacta, precisa, simple, rápida y económica.

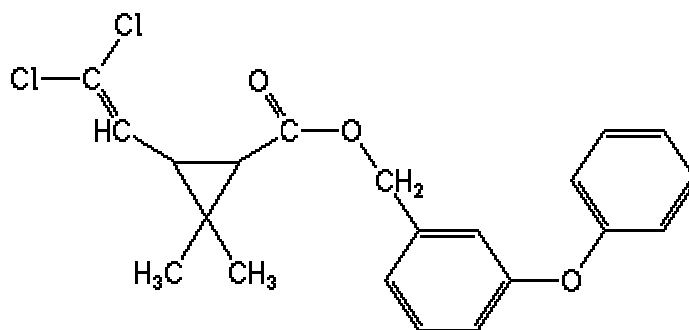
## 2.4 DETERMINACIÓN DE PERMETRINA E IMIDACLOPRID EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS DE USO VETERINARIO

### 2.4.1. PERMETRINA E IMIDACLOPRID. CARACTERÍSTICAS Y ANTECEDENTES ANALÍTICOS

La permetrina es un agente insecticida altamente efectivo, que pertenece a la clase de los piretroides sintéticos (Esquema 2.4). Se trata de un insecticida de contacto, que afecta el sistema nervioso central de los insectos, provocando su muerte.

Se utiliza para el control de insectos plaga masticadores de los cultivos de invernadero agrícolas y hortícolas. También se usa para combatir los insectos voladores y trepadores que afectan a la salud pública, utilizándose en diferentes formulaciones farmacéuticas para el tratamiento de la pediculosis humana. En veterinaria se utiliza como ectoparasiticida para combatir pulgas, garrapatas, mosquitos y jejenes, que afectan a los animales. Generalmente las formulaciones contienen permetrina y otro agente insecticida, el imidacloprid, a los fines de aumentar la eficacia del producto. La combinación de estos dos principios activos actúa sinérgicamente, mejorando su funcionamiento en la prevención y tratamiento de las infecciones.

Estos compuestos se usan bajo la forma de soluciones tópicas, junto a otros excipientes, y son retenidos en la grasa de la piel y en los folículos del pelo del animal, no son absorbidos por el cuerpo y por lo tanto no circulan por el sistema sanguíneo.



Esquema 2.4: Fórmula estructural de la permetrina

En la bibliografía se publican métodos analíticos para la determinación de estos compuestos en formulaciones farmacéuticas, basados fundamentalmente en técnicas de cromatografía líquida de alto rendimiento (García, 2001) y en espectroscopia UV derivada (Kazemipour, 2002).

## 2.4.2. MÉTODO ANALÍTICO

En el presente trabajo se desarrolló un método analítico para la determinación simultánea de permetrina e imidacloprid en pipetas pulguicidas, basado en el análisis de datos espectrales obtenidos con espectroscopia ultravioleta mediante calibración multivariada. La medida espectral se realizó entre 200 y 350 nm y como método de calibración multivariada se utilizó PLS-1.

Los ingredientes activos mencionados, se presentan en el preparado farmacéutico analizado junto a los siguientes excipientes: aceite de almendra, propilencarbonato, alcohol bencílico y butilhidroxitolueno.

El procedimiento analítico seguido para las muestras comerciales, se detalla a continuación:

- h- Se realizó una dilución 1/10000 de las muestras, tomando un volumen de 10.0  $\mu\text{l}$  y llevando con metanol a 100.00 en matraz aforado.
- i- Se obtuvieron los espectros de absorción electrónica en el rango 200-350 nm.

### 2.4.2.1. EQUIPAMIENTO

Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro marca: Perkin Elmer, modelo: Lamba 20, usando celdas de cuarzo de 1.00 cm de camino óptico. Los espectros de absorción electrónica fueron convertidos a formato ASCII y se transfirieron a una PC Pentium 550, para su tratamiento posterior. Las determinaciones por HPLC se realizaron en un cromatógrafo marca Shimadzu, equipado con dos bombas, detector UV (215 nm) e inyector manual (20  $\mu\text{l}$ ).

El método PLS-1, se aplicó utilizando la herramienta MVC1 del programa MATLAB 5.3 (MATLAB 5.3, 1999). Para el análisis de regresión y el tratamiento estadístico de los datos, se utilizó el programa Sigma Plot 5.0.

### 2.4.2.2. REACTIVOS

Los reactivos necesarios para realizar el procedimiento analítico, se prepararon a partir de drogas calidad para análisis y de acuerdo a lo que se detalla a continuación:

- i) Solución *stock* de permetrina: se disolvió la cantidad necesaria de droga sólida en metanol, de manera de lograr una concentración de 400 mg  $\text{l}^{-1}$ .
- j) Solución *stock* de imidacloprid: se disolvió la cantidad necesaria de droga sólida en metanol, de manera de lograr una concentración de 2000 mg  $\text{l}^{-1}$ .

- k) Blanco de muestra: se preparó a partir de los excipientes usados en la formulación de la pipeta y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las muestras comerciales analizadas fueron las elaboradas por el Laboratorio Zoovet (Santa Fe), con un contenido de permetrina de 24.0 g % y de imidacloprid de 6.0 g %.

#### 2.4.2.3. DISEÑO DEL JUEGO DE MUESTRAS DE CALIBRACIÓN

Se trabajó con un juego de 17 muestras preparadas siguiendo 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. Como se ve, se tuvieron en cuenta niveles variables de los excipientes presentes en la preparación, de manera de contemplar probables variaciones en la composición de las muestras analizadas. Además, se verificó que las concentraciones seleccionadas se encuentren dentro del rango de respuesta lineal.

La Tabla 2.23 muestra las concentraciones de los analitos para este juego.

Tabla 2.23: Composición del juego de muestras de calibración de acuerdo a un diseño central compuesto para la aplicación del método PLS-1

Nº de muestra de calibración	Permetrina (mg l <sup>-1</sup> )	Imidacloprid (mg l <sup>-1</sup> )	Excipientes % <sup>a</sup>
1	27.0	9.0	100.0
2	53.0	9.0	100.0
3	40.0	6.0	100.0
4	40.0	12.0	100.0
5	40.0	9.0	67.0
6	40.0	9.0	134.0
7	32.0	7.2	80.0
8	48.0	7.2	80.0
9	32.0	10.8	80.0
10	48.0	10.8	80.0
11	32.0	7.2	120.0
12	48.0	7.2	120.0
13	32.0	10.8	120.0
14	48.0	10.8	120.0
15	40.0	9.0	100.0
16	40.0	9.0	100.0
17	40.0	9.0	100.0

<sup>a</sup> El % es relativo al blanco usual de la muestra comercial.



#### 2.4.2.4. DISEÑO DE LOS JUEGOS DE MUESTRAS DE VALIDACIÓN

Se trabajó con un juego de 11 muestras preparadas 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 %.

La Tabla 2.24 muestra las concentraciones de los analitos para este juego.

Tabla 2.24: Composición del juego de muestras de validación de acuerdo a un diseño central compuesto

Nº de Muestra de validación	Permetrina (mg l <sup>-1</sup> )	Imidacloprid (mg l <sup>-1</sup> )	Excipientes % <sup>a</sup>
1	34.0	9.0	100.0
2	46.0	9.0	100.0
3	40.0	8.0	100.0
4	40.0	10.0	100.0
5	36.0	8.1	100.0
6	44.0	8.1	100.0
7	36.0	9.9	100.0
8	44.0	9.9	100.0
9	40.0	9.0	100.0
10	40.0	9.0	100.0
11	40.0	9.0	100.0

<sup>a</sup> El % es relativo al blanco usual de la muestra comercial.

#### 2.4.3. RESULTADOS

En la Figura 2.17 se pueden observar los espectros de absorción electrónica de permetrina e imidacloprid, ambos en metanol y en concentraciones iguales (20 mg l<sup>-1</sup>), además del espectro obtenido para una pipeta pulguicida comercial conteniendo ambos componentes y luego de diluir 1/10000.

Los datos espectrales obtenidos se analizaron con el método PLS-1 y en primer lugar se realizó la selección del número óptimo de factores por aplicación del procedimiento de validación cruzada, usando el criterio propuesto por Haaland y Thomas (Haaland, 1988), como se hiciera en los casos antes desarrollados en la presente tesis. Se encontró un número óptimo de factores de 4 para la permetrina y de 3 para el imidacloprid.

Como los parámetros estadísticos de la calibración no resultaron del todo satisfactorios, se decidió implementar 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 y se encontraron dos

rangos de sensores para cada componente, sobre los cuales se realizó la calibración. Los parámetros estadísticos obtenidos se presentan en las Tablas 2.25 y 2.26.

Como puede observarse, los parámetros estadísticos de calibración resultan mejores en ambos rangos de sensores seleccionados, respecto a los obtenidos cuando se usa el rango completo.

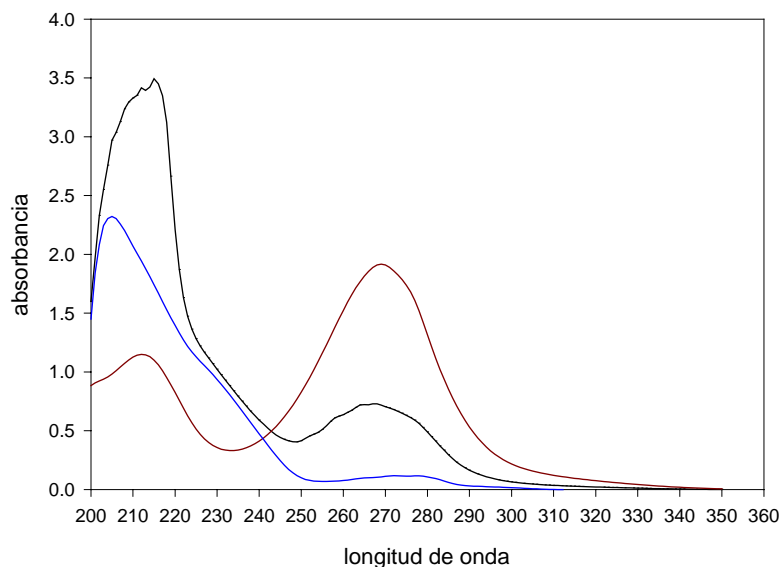


Figura 2.17: Espectros correspondientes a la permetrina (azul) y el imidacoprid (rojo), en concentraciones iguales a 20 mg l<sup>-1</sup> (solución metanólica) y espectro para una pipeta pulgicida comercial (dilución 1/10000 en metanol) conteniendo ambos componentes (negro)

Tabla 2.25: Parámetros estadísticos de la calibración por PLS-1 para la permetrina utilizando distintas regiones de trabajo

	PRESS	REP	R2
Región espectral (nm): 200 - 350 Nº de factores: 4	27.74	3.19	0.9674
Región espectral (nm): 269 - 289 Nº de factores: 5	2.99	1.05	0.9965
Región espectral (nm): 269 - 284 Nº de factores: 5	2.63	0.98	0.9969

Tabla 2.26: Parámetros estadísticos de la calibración por PLS-1 para el imidacloprid utilizando distintas regiones de trabajo

	PRESS	REP	R2
Región espectral (nm): 200 - 350 Nº de factores: 3	12.50	9.53	0.7155
Región espectral (nm): 239 - 279 Nº de factores: 4	1.30	3.20	0.9622
Región espectral (nm): 269 - 294 Nº de factores: 3	0.85	2.58	0.9753

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 los resultados obtenidos se presentan en las Tablas 2.27 y 2.28.

Tabla 2.27: Resultados obtenidos para permetrina por aplicación de PLS-1 al juego de muestras de validación, utilizando distintas regiones para la calibración

Muestra de validación	Concentración adicionada mg l <sup>-1</sup>	Concentración predicha mg l <sup>-1</sup>		
		Región (nm): 200-350 Nº de factores: 4	Región (nm): 269-289 Nº de factores: 5	Región (nm): 269-284 Nº de factores: 5
1	34.00	33.99	33.55	33.12
2	46.00	45.74	46.08	45.85
3	40.00	40.32	42.00	41.49
4	40.00	40.43	42.89	42.30
5	36.00	36.40	39.18	38.69
6	44.00	46.39	48.27	47.46
7	36.00	36.70	39.94	38.74
8	44.00	45.71	49.78	48.53
9	40.00	40.94	46.50	45.50
10	40.00	41.30	46.09	45.03
11	40.00	42.60	46.83	46.01
<i>REP%</i>		3.44	11.62	9.59

Tabla 2.28: Resultados obtenidos para imidacloprid por aplicación de PLS-1 al juego de muestras de validación, utilizando distintas regiones para la calibración

Muestra de validación	Concentración adicionada mg l <sup>-1</sup>	Concentración predicha mg l <sup>-1</sup>		
		Región (nm): 200-350 Nº de factores: 3	Región (nm): 239-279 Nº de factores: 4	Región (nm): 269-294 Nº de factores: 5
1	9.00	8.77	8.98	9.40
2	9.00	9.11	9.16	10.75
3	8.00	8.20	8.40	10.50
4	10.00	9.84	10.24	12.89
5	8.10	8.08	8.76	11.84
6	8.10	8.21	8.82	12.29
7	9.90	8.86	10.06	14.11
8	9.90	9.413	10.47	15.37
9	9.00	8.67	9.78	14.66
10	9.00	8.43	9.47	14.38
11	9.00	8.47	9.42	14.67
<i>REP%</i>		5.20	5.64	49.32

Como puede observarse, los resultados obtenidos para la predicción son mejores cuando se utiliza el rango completo de sensores. Es decir que al realizar una selección de regiones se logra mejorar los parámetros estadísticos de la calibración, pero no se obtiene mejora en la predicción.

Los espectros de absorción obtenidos para las muestras de calibración y para las muestras de validación se presentan en las Figuras 2.18 y 2.19 respectivamente.

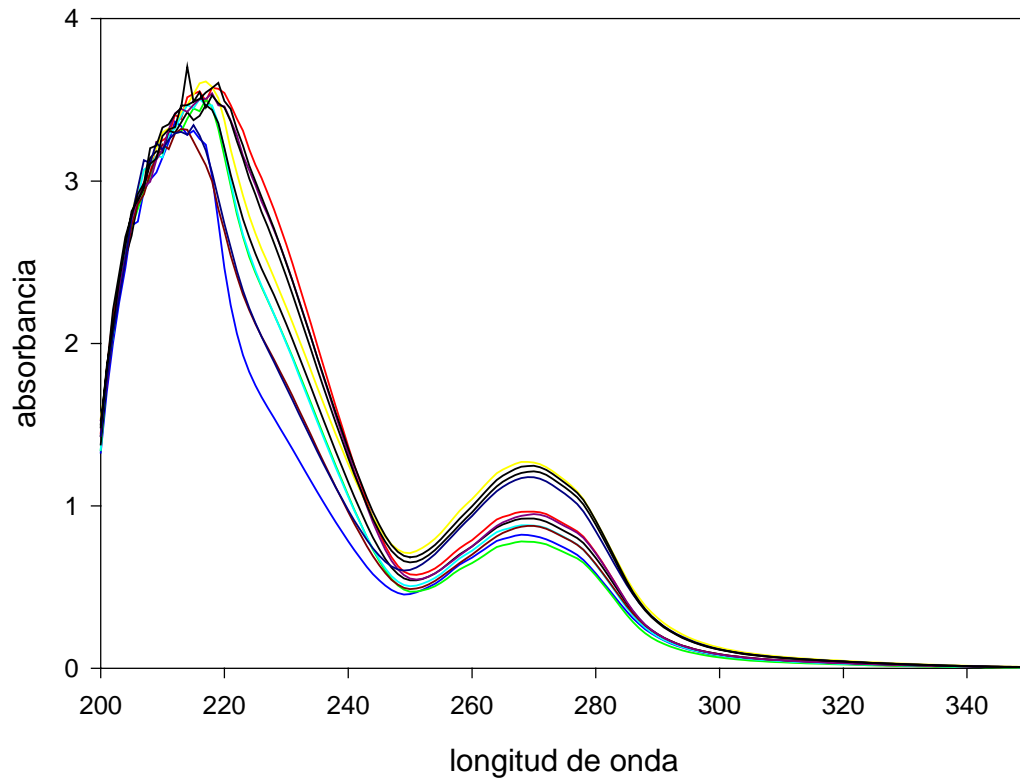


Figura 2.18: Espectros de absorción obtenidos entre 200 y 350 nm para el juego de muestras de calibración

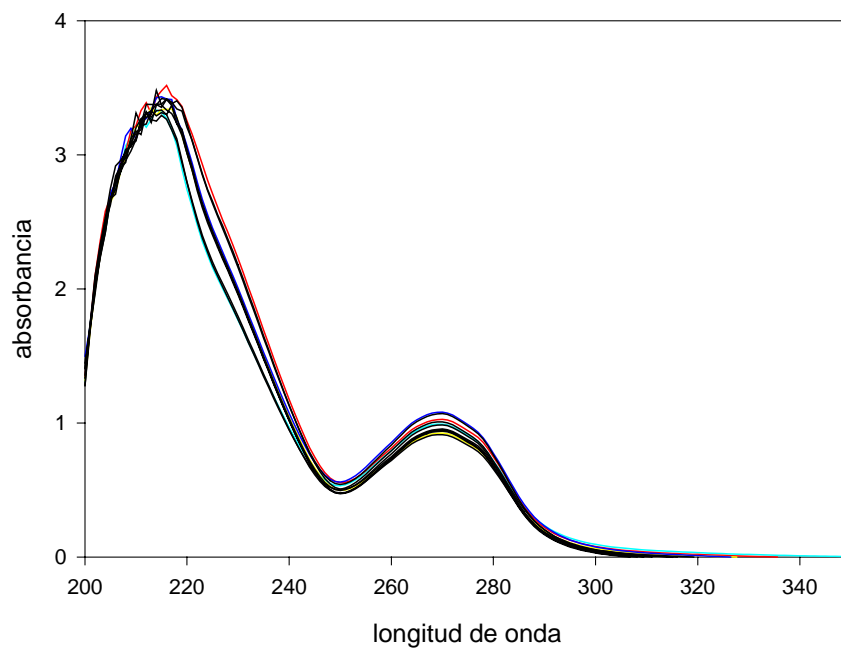


Figura 2.19: Espectros de absorción obtenidos entre 200 y 350 nm para el juego de muestras de validación

En la Tabla 2.29 se presentan los parámetros de calibración y las cifras de mérito obtenidos para ambos componentes activos cuando se trabaja en el rango completo de sensores.

Tabla 2.29: Parámetros de calibración y cifras de mérito obtenidos para la calibración con PLS-1, cuando se trabaja con el rango completo de sensores

	Permetrina	Imidacloprid
Región (nm)	200 - 350	200 - 350
Nº de factores	4	3
$RMSECV$ (mg l <sup>-1</sup> )	1.28	0.86
$REP$ %	3.19	9.53
$\ b_k\ $	16.60	3.72
$\ \epsilon\ $	0.01	0.01
SEN	$6.02 \cdot 10^{-2}$	$2.69 \cdot 10^{-1}$
SEL	$2.92 \cdot 10^{-1}$	$6.54 \cdot 10^{-1}$
$\gamma^{-1}$ (mg l <sup>-1</sup> )	0.17	0.04
$LOD$ (mg l <sup>-1</sup> )	0.50	0.11
$LOQ$ (mg l <sup>-1</sup> )	1.66	0.37

Se construyó una gráfica de concentraciones adicionadas vs. concentraciones predichas, usando para el ajuste cuadrados mínimos ponderados (Massart, 1997), 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). En la Figura 2.20 se puede ver el gráfico correspondiente a esta región para la permetrina y en la Figura 2.21 para el imidacloprid.

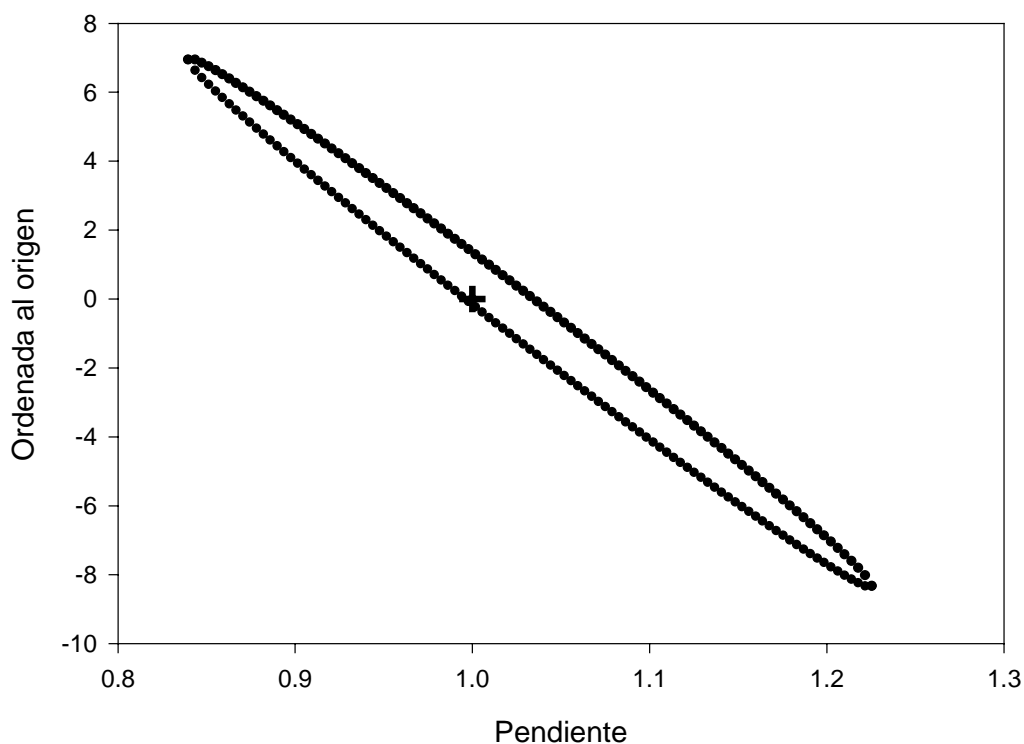


Figura 2.20: Región elíptica de confianza conjunta para la pendiente ( $b$ ) y para la ordenada al origen ( $a$ ), correspondiente al análisis por regresión de las concentraciones adicionadas vs. las concentraciones predichas para permetrina. La marca en forma de cruz corresponde al punto teórico ( $a = 0$ ,  $b = 1$ )

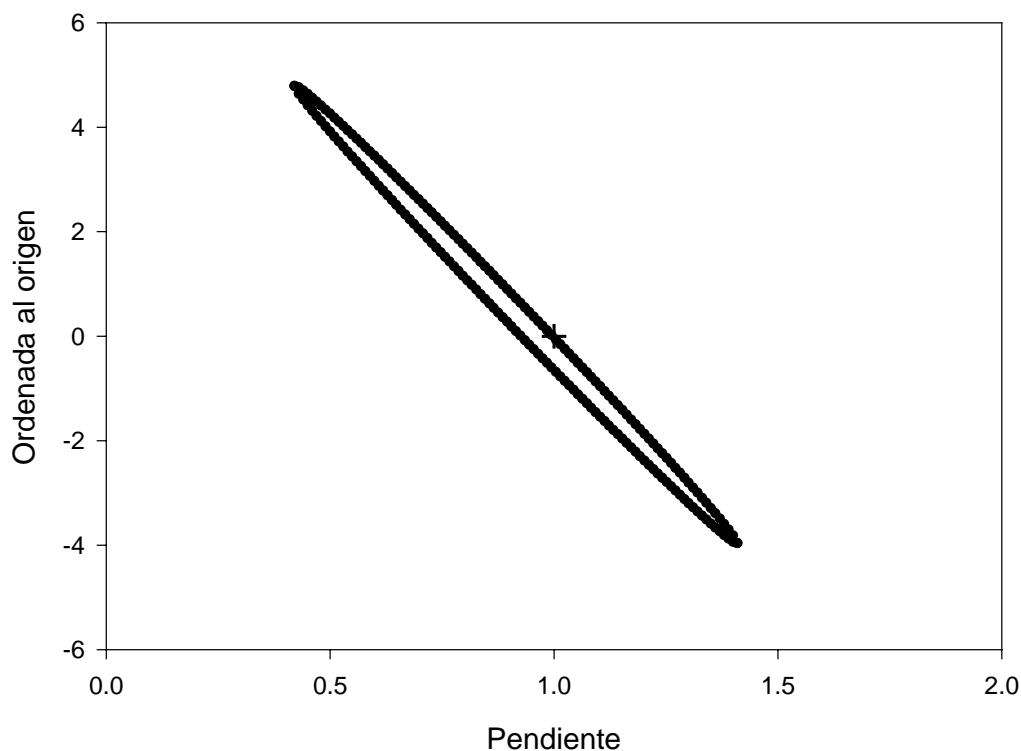


Figura 2.21: Región elíptica de confianza conjunta para la pendiente ( $b$ ) y para la ordenada al origen ( $a$ ), correspondiente al análisis por regresión de las concentraciones adicionadas vs. las concentraciones predichas para imidacloprid. La marca en forma de cruz corresponde al punto teórico ( $a = 0$ ,  $b = 1$ )

Sobre las pipetas comerciales se obtuvieron los resultados que se presentan en la Tabla 2.30:

Tabla 2.30: Resultados obtenidos en las pipetas comerciales marca Zoovet para ambos ingredientes activos

Pipeta comercial	Permetrina g %		Imidacloprid g %	
	Método	Método	Método	Método
	cromatográfico	espectrofotométrico	cromatográfico	espectrofotométrico
1	23.7	22.6 (0.9)	6.55	6.5 (0.5)
2	24.7	23.7 (0.8)	6.46	6.2 (0.5)
3	23.8	22.9 (0.9)	6.59	6.8 (0.6)

Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar para tres replicados.



#### 2.4.4. CONCLUSIONES

La combinación de técnicas que producen señales de primer orden como los espectros de absorción electrónica, y herramientas computacionales como los métodos de calibración multivariada, puede ser una alternativa sencilla a los métodos cromatográficos en el análisis rutinario de las muestras que contienen fármacos. La permetrina y el imidacloprid son principios activos utilizados solos o en forma conjunta, unidos a distintos excipientes en preparaciones de uso veterinario. Frente a la separación temporal conseguida en cromatografía, el presente trabajo se basó en el aislamiento matemático de las señales de los distintos componentes de la muestra, a los fines de realizar la determinación simultánea de ambos principios activos. Se estudió la optimización del modelo de calibración mediante la selección de regiones y se puede concluir que esta estrategia debe ser manejada con cuidado, ya que una rigurosa selección de regiones, si bien conduce al mejoramiento de los parámetros estadísticos de la calibración, como se vio en los casos estudiados con anterioridad, en algunos (como en el presente), también conduce a la pérdida de habilidad predictiva.