



Universidad Nacional del Litoral

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

**Tesis presentada para acceder al grado académico
de Doctora en Ciencias Biológicas**

**Utilización de quimiometría para mejorar el
rendimiento de la
cromatografía líquida de alta resolución**

**Aplicación a la determinación de sustancias de
interés biológico en muestras de composición
compleja**

María Mercedes De Zan

Director: Dr. Héctor C. Goicoechea

**Laboratorio de Desarrollo Analítico y Quimiometría
Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos**

2011

A Aquel que Es

Que Era

Y que Vendrá

Debes amar la arcilla que va en tus manos
Debes amar su arena hasta la locura
Y si no, no la emprendas que será en vano
Sólo el Amor alumbra lo que perdura
Sólo el Amor convierte en milagro el barro.

Debes amar el tiempo de los intentos
Debes amar la hora que nunca brilla
Y si no, no pretendas tocar lo cierto
Sólo el Amor engendra la maravilla
Sólo el Amor consigue encender lo muerto

Silvio Rodríguez

Agradecimientos

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas y a la Universidad Nacional del Litoral por haberme permitido realizar en esta casa el presente trabajo de tesis.

A la Agencia Española de Cooperación Internacional por haber financiado mi estadía en el laboratorio de Espectroscopia Cromatografía y Sensores del Departamento de Hidrogeología y Química Analítica de la Universidad de Almería, España.

Al Dr. Héctor Goicoechea, por haber dirigido el presente trabajo de tesis, por las oportunidades brindadas, los conocimientos compartidos y la confianza depositada. Por haberme alentado e impulsado en todo momento, por tu tiempo y dedicación, por haberme ayudado a crecer, gracias Héctor.

Al Dr. Víctor Mantovani, quien me abrió la puerta de entrada a este camino académico que hoy transito. Por su cariño paternal, sus consejos, su compañía contención y respaldo indispensables para mi, gracias Víctor.

Al Bioq. Juan Carlos Robles, docente, compañero, maestro y amigo, por la solidaridad y la paciencia de estos últimos meses, pero fundamentalmente por tanto tiempo, trabajos y logros compartidos. Por ayudarme a dar el verdadero valor a cada cosa, gracias Caco.

A todos los integrantes del Laboratorio de Espectroscopia Cromatografía y Sensores del Departamento de Hidrogeología y Química Analítica de la Universidad de Almería, España, con quienes compartí días de mucho trabajo, gratos momentos y hermosos paseos. Especialmente a la Dra. María Martínez Galera, por haberme aceptado en su laboratorio y acompañado durante mi estadía, gracias a todos.

A Julia, Vanesa, Mariola y Alicia, por los trabajos que hicimos juntas, por tantas horas de esfuerzo, por el entusiasmo, el compromiso, la dedicación y la generosidad demostrada, gracias chicas.

A todos mis compañeros docentes de la cátedra de química analítica, a los pasantes, becarios y tesistas que transitaron por sus laboratorios, a los que están y a los que estuvieron; de todos aprendí algo. Por los momentos lindos, por lo que aprendimos juntos, gracias a todos.

A mis queridos Yamile, Carla y Gonzalo, porque son el aliento de cada día para seguir adelante, para continuar dando lo mejor y apostando al crecimiento. Por el compañerismo, la solidaridad, el espíritu de grupo y sobretodo, por la alegría con la que llegan y se van cada día del laboratorio, gracias chicos.

A mis padres, ejemplos de superación, de perseverancia, compromiso y responsabilidad. Por los valores que me enseñaron y por el continuo aliento para llegar a esta meta, gracias mamá, gracias papá.

A Daniel, mi esposo, por la grandeza de compartir la vida y la familia que supimos construir. Por todo lo que hemos vivido y crecido juntos, por tu trabajo incansable, por tu paciencia y tu amor incondicional, gracias mi amor.

A mis amadas hijas Julieta, Milena, Ana Paula y María Sol, porque son un maravilloso regalo de Dios que se renueva cada día. Por ser el motor que mueve mi vida, gracias hijitas.

A mis queridas hermanas Mariana, Alejandra y María Eugenia, y a mi tía Cati, por haber sido tantas veces madres de mis hijas, por estar siempre atentas y dispuestas a colaborar en todo. Sin ustedes no hubiera sido posible llegar hasta aquí, gracias chicas.

A todos mis amigos y hermanos del corazón, especialmente a Marisol, Juanchi, Débora, Julio, Huerti, Marcos, Myriam, Marcelo, Elmi y Sergio, simplemente por ser mis amigos. Por ayudarme y alentarme a ser mejor persona cada día, gracias amigos.

La presente tesis posee la siguiente estructura:

Resumen

Publicaciones

Lista de símbolos y abreviaturas

Índice

Objetivos

Capítulo 1: Introducción

Capítulo 2: Nitrato de miconazol en cremas dérmicas. Pureza de pico y validación

Capítulo 3: Nicarbazina en premezclas coccidiostáticas. Diseño experimental

Capítulo 4: Pteridinas en orina. Corrección de línea de base y aplicación de MCR-ALS

Capítulo 5: Tetraciclinas en aguas residuales. Transferencia de calibración y aplicación de U-PLS/RBL

Capítulo 6: Conclusiones generales

Bibliografía

Resumen

La determinación de sustancias de interés biológico, tales como fármacos, agroquímicos, aditivos alimentarios, compuestos endógenos o metabolitos, que se encuentran presentes en bajas concentraciones en muestras de composición compleja, es un gran desafío para la química analítica moderna.

Con el avance de la instrumentación y la informática aplicada, hoy es posible la generación de nuevos métodos de análisis, confiables y seguros, para la determinación de estos compuestos con cada vez mayor selectividad, sensibilidad y rapidez. Se busca, a su vez, que estos procedimientos estén enmarcados dentro de la creciente tendencia de conservación del medioambiente, minimizando el consumo de solventes y reactivos tóxicos.

La cromatografía líquida de alta resolución es una de las técnicas analíticas que está produciendo continuos avances tendientes a mejorar su rendimiento en este tipo de aplicaciones, siendo particularmente su interacción con la quimiometría, una estrategia muy poderosa y promisoría para resolver problemas analíticos de alta complejidad.

En el presente trabajo de tesis se utilizaron diversas herramientas quimiométricas, aplicadas en distintas instancias del proceso analítico, destinadas a alcanzar mejoras significativas en el rendimiento de la cromatografía líquida acoplada a detectores de arreglo de diodo y de fluorescencia.

En la Introducción se comentan los últimos avances de la CLAR y se describen los métodos y algoritmos quimiométricos capaces de interaccionar con ella y contribuir a una mejora de su rendimiento.

En el Capítulo 2 se presenta el desarrollo de un método cromatográfico destinado al control de calidad de cremas dérmicas conteniendo nitrato de miconazol, que permite realizar también una determinación de la estabilidad de los principios activos. Para la comprobación de la selectividad de este método se utilizaron metodologías de evaluación de pureza de pico y se aplicaron además, estrictas estrategias de validación basadas en pruebas estadísticas, para demostrar el rendimiento del método según normas internacionales.

En el Capítulo 3 se demuestra la utilidad del diseño experimental para el desarrollo y optimización de los sistemas cromatográficos complejos mediante la

realización de un reducido número de experimentos. Se presentan los resultados de la optimización y la validación, logrando excelentes parámetros de rendimiento y cortos tiempos de análisis, en un método para la determinación simultánea de los dos componentes de nicarbazina en premezclas anticoccidiostáticas utilizadas en la cría de aves de corral. El método cromatográfico utiliza un reactivo de apareamiento iónico para conseguir buenos parámetros de retención del analito HDP, compuesto de carácter fuertemente básico y polar; y un sistema de gradiente para lograr una rápida elución del analito DNC, de carácter no polar.

En el Capítulo 4 se presenta la aplicación de un algoritmo de calibración de segundo orden: MCR-ALS para resolver problemas de selectividad en la separación cromatográfica, mediante la utilización de la ventaja de segundo orden que permite aislar matemáticamente la señal analítica de los compuestos de interés. Utilizando estrategias diferentes para la aplicación de este algoritmo se logró solucionar distintos inconvenientes, tales como solapamientos de los picos de los analitos, coelución de compuestos desconocidos, identidad espectral entre los compuestos de interés y efecto matriz. El método desarrollado permite determinar con muy alta sensibilidad, mediante la utilización de un detector de fluorescencia, cinco pteridinas presentes en orina en un período muy corto de análisis, por lo que se presenta como una alternativa muy útil en el seguimiento de estos biomarcadores del cáncer.

En el Capítulo 5 se abordó la resolución de un problema analítico muy complejo, tal como la determinación de bajas concentraciones de tetraciclinas como contaminantes en aguas residuales, mediante la utilización de técnicas analíticas sencillas y económicas. Se comprobó la enorme utilidad de los algoritmos de pretratamiento de señales, para realizar, por ejemplo, transferencia de calibración que permite realizar una calibración sencilla evitando la etapa de preconcentración de los patrones. Por otro lado, la corrección de línea de base fue indispensable en la simplificación de los datos analíticos para eliminar señal de fondo y permitir un buen rendimiento de los algoritmos de calibración. Finalmente se aplicó por primera vez a datos cromatográficos un nuevo algoritmo de calibración de segundo orden U-PLS/RBL obteniendo con el mismo un rendimiento comparable al de MCR-ALS.

La presente tesis dio lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones en reuniones científicas:

Publicaciones en revistas científicas

1. Solving matrix-effects exploiting the second order advantage in the resolution and determination of eight tetracycline antibiotics in effluent wastewater by modelling liquid chromatography data with multivariate curve resolution-alternating least squares and unfolded-partial least squares followed by residual bilinearization algorithms. I. Effect of signal pre-treatment. M.M. De Zan, M.D. Gil García, M.J. Culzoni, G.G. Siano, H.C. Goicoechea, M. Martinez Galera. **J. Chromatogr. A** 1179 (2008) 106-114.
2. Solving matrix-effects exploiting the second order advantage in the resolution and determination of eight tetracycline antibiotics in effluent wastewater by modelling liquid chromatography data with multivariate curve resolution-alternating least squares and unfolded-partial least squares followed by residual bilinearization algorithms. II. Prediction and figures of merit. M.D. Gil García, M.J. Culzoni, M.M. De Zan, R. Santiago Valverde, M. Martinez Galera, H.C. Goicoechea. **J. Chromatogr. A** 1179 (2008) 115-124.
3. Development and validation of a simple stability-indicating high performance liquid chromatographic method for the determination of miconazole nitrate in bulk and cream formulations. M.M. De Zan, M.S. Cámara, J.C. Robles, S.V. Kergaravat, H.C. Goicoechea. **Talanta** 79 (2009) 762-767.
4. Determination of marker pteridines in urine by HPLC with fluorimetric detection and second-order multivariate calibration using MCR-ALS. A. Mancha de Llanos, M. M. De Zan, M. J. Culzoni, A. Espinosa-Mansilla, F. Cañada-Cañada, A. Muñoz de la Peña, H. C. Goicoechea. **Anal. Bioanal. Chem.** 399 (2011) 2123-2135.
5. A novel ion-pairing chromatographic method for the simultaneous determination of both nicarbazin components in feed additives. Chemometric tools for improving the optimization and validation. M.M. De Zan, C. M. Teglia, J.C. Robles, H.C. Goicoechea. **Talanta** 85 (2011) 142-150.

6. Enhanced MCR-ALS modeling of HPLC with fast scan fluorimetric detection second-order data for quantitation of marker pteridines in urine. M. J. Culzoni, A. Mancha de Llanos, M. M. De Zan, A. Espinosa-Mansilla, F. Cañada-Cañada, A. Muñoz de la Peña, H. C. Goicoechea. Enviado para su revisión y publicación a la revista **Talanta**.

Presentaciones en reuniones científicas

1. Application of chemometric modelling appealing to the second order advantage to solve interference problems in the determination of emerging contaminants in wastewater. M. Martínez Galera, M.M. De Zan, M.D. Gil García, M.J. Culzoni, R. Santiago Valverde, H.C. Goicoechea. **Second EMCO workshop on Emerging Contaminants in Wastewater: Monitoring Tools and Treatment Technologies**. Belgrado, Serbia, Abril de 2007.

2. Determinación de tetraciclinas como contaminantes en agua por HPLC-DAD y modelado quimiométrico con ventaja de segundo orden. M.M. De Zan, M.D. Gil García, M.J. Culzoni, R. Santiago Valverde, G.G. Siano, H.C. Goicoechea Y M. Martínez Galera. **II Congreso Iberoamericano y IV Congreso Argentino de Química Analítica**. Buenos Aires, Argentina, Agosto de 2007.

3. Effect of PDS, baseline correction and mean centering as signal pretreatments in the resolution of eight tetracyclines by application of MCR-ALS to HPLC-DAD data from effluent wastewater samples. M.D. Gil García, M.M. De Zan, M.J. Culzoni, R. Santiago Valverde, G.G. Siano, H.G. Goicoechea, M. Martínez Galera. **IX International Symposium on Analytical Methodology in The Environmental Field**, Pollensa, España, Octubre de 2007.

4. Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos para la valoración de nitrato de miconazol en cremas antimicóticas. S. V. Kergaravat, M. S. Cámara, M. M. De Zan. **Undecimo Encuentro de Jóvenes Investigadores de Universidades de Santa Fe**. Santa Fe, Argentina, Octubre de 2007.

5. Desarrollo, optimización y validación de un método por cromatografía líquida con apareamiento iónico para la determinación de nicarbazina en preparaciones de uso

veterinario. C.M. Teglia, J.C. Robles, M.M. De Zan, M.S. Cámara. **V Congreso Argentino de Química Analítica**. Bahía Blanca, Argentina, Noviembre de 2009.

6. Multiple response optimization applied to the development of a ion-pairing liquid chromatographic method for the determination of nicarbazin in bulk and pharmaceutical dosage forms. C.M. Teglia, M.S. Cámara, J.C. Robles, M.M. De Zan. **1º Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas**. Córdoba, Argentina, Junio de 2010.

7. Determination of marker pteridines in urine by HPLC with fluorimetric detection and second-order multivariate calibration using MCR-ALS. A. Mancha de Llanos, M.M. De Zan, M.J. Culzoni, A. Espinosa-Mansilla, F. Cañada-Cañada, A. Muñoz de la Peña, H.C. Goicoechea. **VII Colloquium Chemometricum Mediterraneum**. Granada, España, Junio de 2010.

8. Enhanced MCR-ALS modeling of HPLC with fast scan fluorimetric detection second-order data for quantitation of metabolic disorder marker pteridines in urine. A. Mancha de Llanos, M.J. Culzoni, M.M. De Zan, A. Espinosa-Mansilla, F. Cañada Cañada, A. Muñoz de la Peña, H.C. Goicoechea. Aceptado para su presentación en las **13as Jornadas de análisis instrumental** que tendrán lugar en Barcelona, España, Noviembre de 2011.

Lista de símbolos y abreviaturas

| | |
|---------------|---|
| $\ \cdot \ $ | Norma Euclidea de un vector |
| \otimes | Producto de Kronecker |
| α | Nivel axial de un diseño |
| γ_n | Sensibilidad analítica |
| 3-DFC | Diseño factorial completo en tres niveles |
| ACN | Acetonitrilo |
| ALS | Cuadrados mínimos alternantes |
| ANN | Redes neuronales artificiales |
| ANOVA | Análisis de la varianza |
| AS | Acetato de sodio |
| BH2 | Dihidrobiopterina |
| BH4 | Tetrahidrobiopterina |
| BIO | Biopterina |
| BLLS | Cuadrados mínimos bilineales |
| BLLS/RBL | Cuadrados mínimos bilineales seguidos de bilinealización residual |
| CLAI | Cromatografía líquida de apareamiento iónico |
| CLAR | Cromatografía líquida de alta resolución |
| CLAR-2D | Cromatografía líquida de alta resolución bidimensional |
| CLTC | Clortetraciclina |
| CREA | Creatinina |
| CV | Coeficiente de variación |
| D | Función Deseabilidad de Derringer |
| D | Matriz de datos aumentada obtenida em MCR-ALS |
| DAD | Detector de arreglo de diodos |
| DBB | Diseño de Box-Behnken |
| DCC | Diseño central compuesto |
| DEMC | Demeclociclina |
| DF-BR | Detector de fluorescencia de barrido rápido |
| DFC | Diseño factorial completo |
| DFF | Diseño factorial fraccionado |
| $d_i(y_i)$ | Función deseabilidad individual |
| DM | Diseño de mezclas |
| DMD | Diseño de matriz de Doehlert |
| DMF | Dimetilformamida |

| | |
|----------|--|
| DNC | 4,4'-dinitrocarbanilida |
| DOXC | Doxiciclina |
| EC | Electroforesis capilar |
| EEM | Matriz de excitación-emisión |
| EFS | Extracción en fase sólida |
| GC | Cromatografía gaseosa |
| GN | Gauss-Newton |
| GRAM | Método de aniquilación de rango generalizado |
| HDP | 2-hidroxi-4,6-dimetilpirimidina |
| HSS | Heptanosulfonato de sodio |
| IR | Infrarrojo |
| ISO | Isoxantopterín |
| k | Factor estudiado mediante un diseño experimental |
| LOD | Límite de detección |
| LOQ | Límite de cuantificación |
| <u>M</u> | Arreglo de tres vías |
| M | Matriz de datos |
| MCR-ALS | Resolución multivariada de curvas mediante cuadrados mínimos alternantes |
| MEC | Meclociclina |
| MeOH | Metanol |
| MET | Matriz de excitación-tiempo |
| METC | Metaciclina |
| MIC | Miconazol |
| MINC | Minociclina |
| MS | Espectrometría de masa |
| MSR | Metodología de la superficie de respuesta |
| NEO | Neopterin |
| NIC | Nicarbazina |
| N-MIC | Nitrato de miconazol |
| N-PLS | Cuadrados mínimos parciales multivía |
| OVAT | Método de estudio de una variable por vez |
| OXTC | Oxitetraciclina |
| PARAFAC | Análisis paralelo de factores |
| pc | Puntos centrales |
| PCA | Análisis en componentes principales |

| | |
|-----------|--|
| PCR | Regresión en componentes principales |
| PDS | Estandarización directa de Piecewise |
| <i>pe</i> | Puntos estrella o puntos axiales |
| <i>pf</i> | Puntos factoriales |
| PLS | Cuadrados mínimos parciales |
| PT | Pterin |
| PTARs | Plantas de tratamiento de aguas residuales |
| PTFE | Politetrafluoroetileno |
| RBF | Funciones de base radial |
| RBL | Bilinealización residual |
| REP(%) | Error relativo de predicción |
| RES | Variancia residual |
| SG | Sulfato de gentamicina |
| SIMPLISMA | Análisis de mezclas que estima número de componentes y espectros puros |
| SVD | Descomposición en valores singulares |
| TC | Tetraciclina |
| TCs | Tetraciclinas |
| THF | Tetrahidrofurano |
| UPLC | Cromatografía líquida de ultra alta presión |
| U-PLS | Cuadrados mínimos parciales desdoblados |
| U-PLS/RBL | Cuadrados mínimos parciales desdoblados seguidos de bilinealización residual |
| UV | Ultravioleta |
| UV-Vis | Ultravioleta-Visible |
| VB | Valerato de betametasona |
| vec | Operación de vectorización |
| XAN | Xantopterin |

Índice de contenidos

| | Página |
|---|--------|
| Objetivos | 1 |
| Capítulo 1: Introducción | 2 |
| 1.1. El análisis químico de sustancias de interés biológico | 2 |
| 1.2. El proceso analítico en esta problemática actual | 3 |
| 1.2.1. Separaciones analíticas | 4 |
| 1.2.2. Mediciones analíticas | 6 |
| 1.3. Avances y situación actual de la cromatografía líquida | 7 |
| 1.4. Tipos de datos adquiridos en cromatografía | 9 |
| 1.5. Quimiometría: Aportes a la cromatografía | 11 |
| 1.5.1. Aplicaciones | 11 |
| 1.6. Optimización de métodos cromatográficos | 12 |
| 1.6.1. Diseño experimental | 15 |
| 1.6.2. Metodología de la Superficie de Respuesta | 17 |
| 1.6.2.1. Diseños de segundo orden | 18 |
| 1.6.2.1.1. Requisitos de los diseños | 18 |
| 1.6.2.1.2. Tipos de diseños de optimización. Características | 19 |
| 1.6.2.2. Construcción de los modelos | 20 |
| 1.6.2.3. Evaluación de los modelos | 20 |
| 1.6.2.4. Localización del óptimo | 21 |
| 1.6.3. Optimización multirespuesta. Función Deseabilidad de Derringer | 22 |
| 1.6.3.1. Deseabilidad individual | 23 |
| 1.6.3.2. Deseabilidad global | 26 |
| 1.7. Pretratamiento de señales | 26 |
| 1.7.1. El algoritmo de Eilers | 28 |
| 1.8. Pureza de pico | 30 |
| 1.8.1. Correlación espectral | 32 |
| 1.8.2. Factor de pureza y curva de similitud | 33 |
| 1.9. Calibración | 34 |
| 1.9.1. Calibración univariada por regresión lineal simple | 38 |
| 1.9.1.1. Evaluación del modelo | 39 |

| | |
|---|----|
| 1.9.1.2. Cifras de mérito | 40 |
| 1.9.1.3. Comparación de pendientes | 41 |
| 1.9.2. Calibración multivariada | 42 |
| 1.9.2.1. Algoritmos de calibración de primer orden | 42 |
| 1.9.2.2. Algoritmos de calibración de segundo orden | 43 |
| 1.9.2.3. Vectorización de datos de segundo orden | 44 |
| 1.9.2.4. Estructura y arreglo de los datos de segundo orden | 44 |
| 1.9.2.5. MCR-ALS | 46 |
| 1.9.2.5.1. Cifras de mérito | 51 |
| 1.9.2.6. U-PLS/RBL | 51 |
| 1.9.2.6.1. Cifras de mérito | 54 |
| 1.9.3. Transferencia de calibración | 55 |
| 1.10. Validación | 56 |
| | |
| Capítulo 2: Nitrato de miconazol en cremas dérmicas | |
| Pureza de pico y validación | 57 |
| | |
| 2.1. Miconazol | 58 |
| 2.1.1. Características físico-químicas | 58 |
| 2.1.2. Propiedades antibióticas y usos | 58 |
| 2.2. Cremas dérmicas | 59 |
| 2.3. El problema analítico | 60 |
| 2.3.1. Métodos oficiales | 61 |
| 2.3.2. Métodos de la literatura | 64 |
| 2.3.3. Selección de la metodología | 64 |
| 2.4. Objetivos | 65 |
| 2.5. Materiales y métodos | 65 |
| 2.5.1. Instrumental y <i>softwares</i> | 65 |
| 2.5.2. Reactivos | 66 |
| 2.5.3. Muestras | 66 |
| 2.5.4. Pretratamiento de la muestra | 67 |
| 2.5.5. Soluciones | 69 |
| 2.5.5.1. Solvente de extracción y diluyente | 69 |
| 2.5.5.2. Soluciones estándar | 69 |
| 2.5.5.3. Soluciones muestra | 70 |

| | |
|---|----|
| 2.5.5.4. Soluciones de excipientes y otros principios activos | 70 |
| 2.5.6. Sistema cromatográfico | 71 |
| 2.5.7. Validación | 71 |
| 2.5.7.1. Selectividad | 72 |
| 2.5.7.2. Adecuación del sistema y estabilidad de las soluciones | 72 |
| 2.5.7.3. Linealidad y rango | 72 |
| 2.5.7.4. Precisión y exactitud | 73 |
| 2.6. Resultados y discusión | 73 |
| 2.6.1. Desarrollo del método | 73 |
| 2.6.1.1. Extracción | 73 |
| 2.6.1.2. Cromatografía | 74 |
| 2.6.2. Calibración y validación | 75 |
| 2.6.2.1. Selectividad del método y estabilidad de las muestras | 75 |
| 2.6.2.2. Adecuación del sistema | 79 |
| 2.6.2.3. Estabilidad de las soluciones | 80 |
| 2.6.2.4. Linealidad y rango | 80 |
| 2.6.2.5. Precisión y exactitud | 82 |
| 2.6.3. Aplicaciones | 82 |
| 2.7. Conclusiones | 83 |
| | |
| Capítulo 3: Nicarbazina en premezclas coccidiostáticas | |
| Diseño experimental | 84 |
| | |
| 3.1. Nicarbazina | 84 |
| 3.1.1. Características físico-químicas | 84 |
| 3.1.2. Propiedades anticoccidiales | 85 |
| 3.1.3. Farmacocinética | 85 |
| 3.1.4. Efectos secundarios | 86 |
| 3.1.5. Usos y regulación | 86 |
| 3.2. Premezclas | 87 |
| 3.3. El problema analítico | 88 |
| 3.3.1. Antecedentes | 89 |
| 3.3.2. Selección de la metodología | 90 |
| 3.4. Objetivos | 90 |
| 3.5. Materiales y métodos | 91 |

| | |
|--|-----|
| 3.5.1. Instrumental y <i>softwares</i> | 91 |
| 3.5.2. Reactivos | 91 |
| 3.5.3. Muestras | 91 |
| 3.5.3.1. Procedimiento de extracción | 92 |
| 3.5.4. Soluciones | 92 |
| 3.5.4.1. Fase móvil y diluyentes | 92 |
| 3.5.4.2. Soluciones estándar | 93 |
| 3.5.4.3. Soluciones muestra | 93 |
| 3.5.5. Desarrollo del método cromatográfico | 94 |
| 3.5.6. Optimización | 97 |
| 3.5.6.1. Selección de las variables: respuestas y factores | 97 |
| 3.5.6.2. Selección del diseño de optimización | 97 |
| 3.5.6.3. Construcción del DCC | 98 |
| 3.5.6.3.1. Selección de los niveles | 99 |
| 3.5.6.3.2. Selección del valor de α | 100 |
| 3.5.6.3.3. Bloqueo | 100 |
| 3.5.6.3.4. Puntos centrales | 101 |
| 3.5.6.4. Evaluación del diseño | 101 |
| 3.5.6.5. Experimentos y respuestas | 102 |
| 3.5.7. Validación | 103 |
| 3.5.7.1. Adecuación del sistema | 103 |
| 3.5.7.2. Selectividad | 104 |
| 3.5.7.3. Linealidad, precisión y exactitud | 105 |
| 3.6. Resultados y discusión | 105 |
| 3.6.1. Optimización de la separación cromatográfica | 105 |
| 3.6.1.1. Ajuste de los modelos y obtención de las superficies de respuesta | 105 |
| 3.6.1.2. Aplicación de la función Deseabilidad | 107 |
| 3.6.2. Validación y cifras de mérito | 112 |
| 3.6.2.1. Selectividad | 112 |
| 3.6.2.2. Linealidad y rango | 112 |
| 3.6.2.3. Precisión y exactitud | 113 |
| 3.6.3. Aplicaciones | 114 |
| 3.7. Conclusiones | 115 |

| | |
|---|-----|
| Capítulo 4: Pteridinas en orina | |
| Corrección de línea de base y aplicación de MCR-ALS | 116 |
| 4.1. Pteridinas | 116 |
| 4.1.1. Características físico-químicas | 116 |
| 4.1.2. Funciones bioquímicas | 117 |
| 4.1.3. Las pteridinas como biomarcadores | 118 |
| 4.2. Orina | 119 |
| 4.3. El problema analítico | 119 |
| 4.3.1. Antecedentes | 120 |
| 4.3.2. Situación actual | 121 |
| 4.3.3. Selección de la metodología | 122 |
| 4.4. Objetivos | 123 |
| 4.5. Materiales y métodos | 124 |
| 4.5.1. Instrumental y softwares | 124 |
| 4.5.2. Reactivos | 124 |
| 4.5.3. Muestras | 124 |
| 4.5.4. Soluciones | 125 |
| 4.5.4.1. Fase móvil y diluyente | 125 |
| 4.5.4.2. Soluciones estándar | 125 |
| 4.5.4.3. Soluciones muestra | 126 |
| 4.5.5. Diseño experimental | 127 |
| 4.5.6. Sistema cromatográfico | 128 |
| 4.5.7. Adquisición y procesamiento de datos | 129 |
| 4.6. Resultados y discusión | 130 |
| 4.6.1. Optimización de la separación cromatográfica | 130 |
| 4.6.2. Análisis de datos | 133 |
| 4.6.3. Corrección de línea de base | 134 |
| 4.6.4. Calibración por MCR-ALS | 135 |
| 4.6.4.1. Estrategia 1 | 135 |
| 4.6.4.2. Estrategia 2 | 138 |
| 4.6.4.3. Curvas de calibración pseudounivariadas | 140 |
| 4.6.5. Validación y cifras de mérito | 141 |
| 4.6.6. Aplicaciones | 143 |
| 4.6.7. Proyecciones | 143 |
| 4.7. Conclusiones | 144 |

| | |
|--|-----|
| Capítulo 5: Tetraciclinas en aguas residuales | |
| Transferencia de calibración y aplicación de U-PLS/RBL | 145 |
| 5.1. Tetraciclinas | 145 |
| 5.1.1. Características físico-químicas | 145 |
| 5.1.2. Historia, mecanismo de acción y usos | 146 |
| 5.1.3. Farmacocinética | 147 |
| 5.2. Aguas residuales | 147 |
| 5.3. El problema analítico | 148 |
| 5.3.1. Antecedentes | 150 |
| 5.3.2. Selección de la metodología | 151 |
| 5.4. Objetivos | 152 |
| 5.5. Materiales y métodos | 153 |
| 5.5.1. Instrumental y softwares | 153 |
| 5.5.2. Reactivos y cartuchos | 154 |
| 5.5.3. Muestras | 154 |
| 5.5.4. Soluciones | 154 |
| 5.5.4.1. Fase móvil y solvente de inyección | 155 |
| 5.5.4.2. Soluciones estándar | 155 |
| 5.5.4.3. Soluciones muestra | 155 |
| 5.5.5. Procedimiento de pretratamiento de muestra | 156 |
| 5.5.6. Desarrollo del método cromatográfico | 157 |
| 5.5.7. Adquisición y pretratamiento de datos | 158 |
| 5.5.8. Modelos de calibración | 159 |
| 5.5.8.1. MCR-ALS | 159 |
| 5.5.8.1.1. Obtención de los arreglos de datos | 159 |
| 5.5.8.1.2. Construcción de los modelos | 159 |
| 5.5.8.2. U-PLS/RBL | 160 |
| 5.6. Resultados y discusión | 160 |
| 5.6.1. Extracción en fase sólida | 160 |
| 5.6.2. Sistema cromatográfico | 161 |
| 5.6.3. Análisis y pretratamiento de los datos | 163 |
| 5.6.3.1. Transferencia de calibración | 164 |
| 5.6.3.2. Corrección de línea de base | 166 |
| 5.6.4. Modelos de calibración | 168 |
| 5.6.4.1. Calibración univariada. Validación del sistema cromatográfico | 168 |

| | <i>Índice</i> |
|--|---------------|
| 5.6.4.2. Calibración por MCR-ALS | 169 |
| 5.6.4.2.1. Contribución del algoritmo de corrección de línea de base | 169 |
| 5.6.4.2.2. Extracción de los perfiles | 170 |
| 5.6.4.2.3. Regresión | 172 |
| 5.6.4.3. Calibración por U-PLS/RBL | 172 |
| 5.6.4.4. Análisis comparativo de los modelos. Cifras de mérito | 173 |
| 5.6.5. Predicciones | 174 |
| 5.7. Conclusiones | 176 |
| | |
| Capítulo 6: Conclusiones generales | 178 |
| | |
| Bibliografía | 181 |

Índice de Tablas

| | Página |
|---|--------|
| Tabla 1.1: Factores variables de un método cromatográfico | 13 |
| Tabla 1.2: Estrategias de calibración | 35 |
| Tabla 1.3: Requerimiento de las diferentes estrategias de calibración | 37 |
| Tabla 2.1: Métodos oficiales de análisis y especificaciones para N-MIC | 62 |
| Tabla 2.2: Composición de la crema base | 67 |
| Tabla 2.3: Gradiente de elución para la separación de MIC | 71 |
| Tabla 2.4: Parámetros característicos del pico de MIC | 79 |
| Tabla 2.5: Parámetros de calibración | 80 |
| Tabla 2.6: Cifras de mérito para precisión y exactitud | 82 |
| Tabla 3.1: Premezclas comerciales con actividad anticoccidial | 88 |
| Tabla 3.2: Gradiente de elución para la separación de NIC | 96 |
| Tabla 3.3: Comparación de diseños de superficie de respuesta | 98 |
| Tabla 3.4: Niveles de los factores | 99 |
| Tabla 3.5: Experimentos y respuestas | 103 |
| Tabla 3.6: Términos y ANOVA de los modelos | 106 |
| Tabla 3.7: Criterios de optimización | 109 |
| Tabla 3.8: Cifras de mérito | 113 |
| Tabla 3.9: Resultados obtenidos al analizar NIC en muestras comerciales | 115 |
| Tabla 4.1: Concentraciones de calibración | 126 |
| Tabla 4.2: Concentraciones de fortificación | 126 |
| Tabla 4.3: Experimentos de optimización | 128 |
| Tabla 4.4: Gradiente de elución para la separación de pteridinas | 129 |
| Tabla 4.5: Evaluación de los modelos | 131 |
| Tabla 4.6: Criterios de optimización | 131 |
| Tabla 4.7: Componentes estimados en cada región por SVD | 136 |
| Tabla 4.8: Predicciones de las muestras de validación | 142 |
| Tabla 4.9: Niveles de pteridinas en orinas de niños enfermos | 143 |
| Tabla 5.1: Composición de las muestras de validación | 156 |
| Tabla 5.2: Regiones de las matrices de datos empleadas para el análisis de cada analito | 158 |
| Tabla 5.3: Recuperaciones en función del volumen preconcentrado | 161 |
| Tabla 5.4: Programa de gradiente para la separación cromatográfica de tetraciclinas | 162 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 5.5: Cifras de mérito de la calibración univariada | 169 |
| Tabla 5.6: Componentes del sistema y correlación de los perfiles | 170 |
| Tabla 5.7: Cifras de mérito para los modelos MCR-ALS y U-PLS/RBL | 174 |
| Tabla 5.8: Predicciones obtenidas para las muestras de validación por MCR-ALS | 175 |
| Tabla 5.9: Predicciones obtenidas para las muestras de validación por U-PLS/RBL | 176 |

Índice de Figuras

| | Página |
|--|--------|
| Figura 1.1: Superficies obtenidas con datos cromatográficos de segundo orden | 10 |
| Figura 1.2: Superficie de respuesta y gráfica de contorno | 22 |
| Figura 1.3: Función deseabilidad para un valor fijo | 24 |
| Figura 1.4: Función deseabilidad para un valor máximo | 25 |
| Figura 1.5: Corrección de línea de base | 29 |
| Figura 1.6: Gráfica de pureza de pico | 34 |
| Figura 1.7: Arreglos de datos de segundo orden | 45 |
| Figura 1.8: Obtención de matrices aumentadas en MCR-ALS | 50 |
| Figura 1.9: Pasos del algoritmo UPL-RBL | 54 |
| Figura 2.1: Estructura química del nitrato de miconazol | 58 |
| Figura 2.2: Esquema del procedimiento de extracción | 68 |
| Figura 2.3: Señal cromatográfica de la solución estándar | 75 |
| Figura 2.4: Señal cromatográfica de la solución muestra de crema | 76 |
| Figura 2.5: Cromatograma de una muestra envejecida de crema de N-MIC | 77 |
| Figura 2.6: Cromatograma de una muestra envejecida de crema de N-MIC en asociación con VB y SG | 77 |
| Figura 2.7: Estudio de los productos de degradación | 78 |
| Figura 2.8: Estudio de pureza de pico | 79 |
| Figura 2.9: Distribución de los residuos | 81 |
| Figura 3.1: Estructura química de la nicarbazina | 84 |
| Figura 3.2: Cromatogramas de la etapa de desarrollo | 95 |
| Figura 3.3: Espectros de absorción de los analitos | 96 |
| Figura 3.4: Esquema representativo de un DCC | 99 |
| Figura 3.5: Error estándar de las predicciones | 102 |
| Figura 3.6: Superficies de respuesta y modelos ajustados | 108 |
| Figura 3.7: Deseabilidades individuales | 110 |
| Figura 3.8: Deseabilidad global | 110 |
| Figura 3.9: Cromatograma de una muestra real en condiciones optimizadas | 111 |
| Figura 4.1: Estructura química de las principales pteridinas de los fluidos biológicos humanos | 117 |
| Figura 4.2: Superficies de respuesta para la deseabilidad | 132 |
| Figura 4.3: Resolución de analitos en condiciones optimizadas | 133 |

| | |
|--|-----|
| Figura 4.4: Representación del sistema en estudio | 134 |
| Figura 4.5: Corrección de línea de base por el algoritmo de Eilers | 135 |
| Figura 4.6: Regiones generadas en la estrategia 1 | 136 |
| Figura 4.7: Perfiles extraídos por MCR-ALS para la región 1 mediante E1 | 137 |
| Figura 4.8: Perfiles extraídos por MCR-ALS para la región completa mediante E2 | 139 |
| Figura 4.9: Efecto matriz visualizado en las curvas de calibrado | 140 |
| Figura 5.1: Estructura química de las tetraciclinas | 145 |
| Figura 5.2: Señal cromatográfica de los analitos puros | 162 |
| Figura 5.3: Representación de la matriz de datos de los analitos puros | 163 |
| Figura 5.4: Señal cromatográfica de los extractos de aguas residuales | 164 |
| Figura 5.5: Recuperación de analitos en la EFS | 165 |
| Figura 5.6: Transferencia de calibración | 166 |
| Figura 5.7: Corrección de línea de base por el algoritmo de Eilers | 167 |
| Figura 5.8: Corrección de las matrices de datos | 168 |
| Figura 5.9: Perfiles cromatográficos y espectrales de MCR-ALS para la Región 8 de R1 | 171 |
| Figura 5.10: Perfiles cromatográficos y espectrales de MCR-ALS para la Región 6 de una muestra basal de agua residual | 171 |
| Figura 5.11: Perfiles MCR-ALS empleados para la calibración | 172 |
| Figura 5.12: Perfiles cromatográficos y espectrales de MCR-ALS y de U-PLS/RBL extraídos para la Región 2 | 173 |



María Mercedes De Zan -2011

Objetivos generales

1. Contribuir al desarrollo de la química analítica en general y al análisis cromatográfico en particular.
2. Desarrollar y validar métodos sencillos por cromatografía líquida para el análisis de sustancias de interés biológico en muestras complejas y de naturaleza variable.
3. Estudiar la capacidad de las herramientas quimiométricas para mejorar el rendimiento de la cromatografía líquida.

Objetivos específicos

1. Utilizar distintas modalidades de la cromatografía líquida (fase normal, fase reversa, control de ionización, apareamiento iónico) para el desarrollo de métodos de análisis.
2. Aplicar diseño experimental para la optimización de los métodos cromatográficos desarrollados para obtener bajo costo y tiempos cortos de análisis.
3. Generar datos de segundo orden mediante la utilización de los detectores de arreglo de diodo y de fluorescencia para la aplicación de calibración multivariada en la resolución de interferencias y solapamientos de picos.
4. Aplicar algoritmos de preprocesamiento de la señal analítica para mejorar la calidad de los datos.
5. Aportar a la comunidad científica métodos eficientes de análisis, validados según normas internacionales, para su aplicación en la industria farmacéutica, la bioquímica clínica y organismos de regulación y control.

Capítulo 1



Introducción

1.1. El análisis químico de sustancias de interés biológico

Frecuentemente las ciencias médicas, la bioquímica, la biotecnología, la industria farmacéutica y las ciencias medioambientales necesitan para su desarrollo de la determinación de sustancias de interés biológico que están inmersas en muestras de composición muy compleja y a veces en muy bajas concentraciones.

La determinación de estos compuestos tiene muchas veces implicancias que van más allá del desarrollo científico-tecnológico, interviniendo en la toma de decisiones en los ámbitos económicos y sociales (Valcarcel 1999).

Para dar algunos ejemplos, el continuo descubrimiento de nuevos **fármacos**, la generación de medicamentos de base biotecnológica, la fitoterapia, los estudios de biodisponibilidad, el monitoreo terapéutico de drogas y el control de doping, generan continuamente la necesidad de determinar estas sustancias en matrices diversas que abarcan desde las preparaciones farmacéuticas y los cultivos biotecnológicos, hasta las diferentes muestras biológicas como sangre, orina o tejidos (Huestis y Smith 2006, Thevis y col 2008, Steinmann y col 2010, Liu y col 2011).

De igual manera, el avance de la medicina personalizada en la era de la “**ómica**” (genómica, proteómica, metabolómica) requiere de la utilización de métodos de análisis y plataformas tecnológicas de última generación para la determinación de **biomarcadores** específicos que permiten hacer un perfil pormenorizado de cada paciente a los fines de programar un tratamiento adecuado (Lim y col 2011, Galvez y col 2011).

Por otro lado, la utilización masiva de agroquímicos, como así también de conservantes y aditivos alimentarios y el consiguiente avance de la legislación regulatoria en este campo, es otra área en la cual se genera una continua demanda de métodos para la determinación de **residuos** de estas sustancias en los alimentos a los fines de garantizar la seguridad alimentaria de la población (Ridgway y col 2007, Zygler y col 2009, Ledoux 2011).

Finalmente, la contaminación medioambiental con fármacos, productos de limpieza y cosmética, materiales nanoparticulados y diversos tipos de químicos a los que se ha denominado como **contaminantes emergentes** es, en este momento, un motivo de preocupación en muchos países. Esta temática ha llevado a la creación de una extensa área de investigación, para lograr la identificación y cuantificación de estos compuestos; así como el esclarecimiento de las vías de transformación de los mismos en las plantas de tratamiento de agua o en matrices ambientales, la evaluación de sus efectos biológicos potenciales, y el desarrollo y aplicación de

tratamientos para su remoción y/o mineralización (Wise y col 2006, Richardson 2007, Barceló y Petrovic 2007, Farre y col 2010, Fatta-Kassinos y col 2011).

Es así, que en los últimos años, las investigaciones en química analítica se han orientado a este tipo de problemáticas, siendo su gran desafío actual el desarrollo de nuevas herramientas y recursos analíticos o la mejora de los existentes para dar respuesta a este tipo de demandas. Con el avance de la instrumentación y la informática aplicada se requiere de la generación de nuevos métodos de análisis, confiables y seguros, que permitan determinar los compuestos de interés cada vez con mayor selectividad, sensibilidad y rapidez. A esto se le suma otro gran reto proveniente del creciente auge de la **química verde**: el de aplicar metodologías amigables con el medioambiente, es decir que utilicen reactivos no tóxicos o pequeñas cantidades de los mismos (Wardencki y col 2007, Farré y col 2010).

1.2. El proceso analítico en esta problemática actual

El **proceso analítico** es el conjunto de operaciones que separa a la muestra sin tomar, sin medir y sin tratar, de los resultados generados y expresados según los requerimientos del **problema analítico** planteado (Valcarcel 1999).

El problema analítico puede ser considerado como una interfase entre el actor que solicita la información y el químico analítico que la genera y está definido por una serie de factores a tener en cuenta:

- a. El **sistema** del que se requiere la información: un río, un alimento, un medicamento, el metabolismo de un organismo, etc.
- b. La **implicancia** socio-económica o científico-técnica de la información solicitada.
- c. El tipo de **muestras** disponibles, que son las alícuotas en el tiempo y en el espacio del sistema en estudio.
- d. Los **analitos**, es decir las sustancias cuya presencia o concentración se quiere determinar.
- e. La **matriz**, es decir todo aquello que conforma la muestra y que es distinto del analito.
- f. Los **requerimientos de calidad** del resultado a obtener, que están generalmente establecidos por un ente u organismo regulador.
- g. La **urgencia** del resultado requerido y el **costo** del análisis.

Para una adecuada sistematización el proceso analítico se puede considerar dividido en tres etapas generales:

1. Etapa de las operaciones previas o etapa **preanalítica**, cuyo objetivo es la adecuación de la muestra a los requisitos de la medición propiamente dicha.
2. Etapa de la medida y transducción de la señal analítica o **etapa analítica**, que está directamente relacionada con las características o concentración del analito y que implica el uso de una técnica analítica, generalmente a través del uso de un instrumento.
3. Etapa de adquisición de señales y tratamiento de datos o **etapa postanalítica**, cuyo objetivo es procesar los datos para obtener los resultados de acuerdo a lo requerido.

1.2.1. Separaciones analíticas

A la hora de diseñar el proceso analítico para la resolución de un problema concreto, debe tenerse en cuenta que pocas técnicas de medida, o quizás realmente ninguna de las empleadas en el análisis químico, son específicas para una sola especie. Como consecuencia, una parte importante de la mayoría de los análisis consiste en lidiar con las especies extrañas que atenúan la señal producida por el analito o producen una señal adicional imposible de distinguir de la señal de interés. Una sustancia que afecta a una señal analítica se llama **interferente** o **interferencia** (Skoog y col 2005).

Para solventar los problemas de **especificidad** que generan las interferencias se han utilizado diferentes estrategias como la modificación de la matriz, el enmascaramiento, la dilución o la saturación. También los métodos de calibración con estándar interno y los métodos de adiciones de estándar pueden utilizarse en algunas ocasiones para compensar o reducir los efectos de las interferencias y de la matriz. Sin embargo, la **separación** del analito de los potenciales interferentes es sin dudas la estrategia más eficiente.

Clásicamente, esta separación se logra o intenta lograr, en la etapa preanalítica mediante un procedimiento de **separación física**, en la que se obtiene al analito aislado de la interferencia para aplicar luego sobre el mismo el procedimiento de medición o identificación.

En cuanto a las técnicas de pretratamiento de muestras, aplicadas actualmente en el análisis químico de sustancias de interés biológico a los fines de lograr la separación física y alcanzar la concentración adecuada de analitos, se pueden destacar (Rubinson y Rubinson 2000, Smith 2003):

- **Precipitación**, utilizada fundamentalmente para eliminar las proteínas de las muestras biológicas, se realiza generalmente con solventes orgánicos, ácidos o sales.
- **Centrifugación y/o filtración**, necesarias para eliminar materiales insolubles precipitados o en suspensión que interfieren en la medición de la señal o producen inconvenientes en los instrumentos.
- **Destilación o evaporación**, muy útiles para eliminar solventes y concentrar el analito.
- **Extracción líquido-líquido**, basada en la solubilidad diferencial de un compuesto en dos líquidos inmiscibles, logra separar el analito en una fase y las interferencias en otra. Sus versiones más modernas, la **micro-extracción en fase líquida** y la **micro-extracción en gota** consisten en la automatización y miniaturización del procedimiento, reduciendo el consumo de solventes (Pedersen-Bjergaard y Rasmussen 2005, Dietz y col 2006).
- **Extracción en fase sólida**, basada en la partición de los compuestos entre una fase líquida de la muestra y una fase sólida del sorbente o extractante, es muy útil para lograr simultáneamente la purificación y preconcentración del analito. Existen varios formatos para esta técnica (Smith 2003, Pedersen-Bjergaard y Rasmussen 2005, Dietz y col 2006, Musteata y Pawliszyn 2007):
 - **Extracción en fase sólida en discos** compuestos por partículas poliméricas o de sílice modificada, unidas fuertemente a una matriz de politetrafluoroetileno e impregnados en un disco de fibra de vidrio.
 - **Extracción en fase sólida en cartuchos** empacados con partículas cromatográficas de sílica, silanos o polímeros. Pueden utilizarse para retener al analito de interés, permitiendo que las interferencias y los componentes de la matriz pasen a través del cartucho, o por el contrario, para retener las interferencias permitiendo que los compuestos de interés pasen purificados a través de la columna.
 - **Microextracción en fase sólida**, que es una miniaturización de la extracción en fase sólida en donde el sorbente se presenta unido a una delgada fibra. Existen una variedad de sorbentes útiles en el análisis de proteínas, compuestos polares y no polares, fármacos, surfactantes y/o pesticidas en muestras medioambientales, biológicas y de alimentos.
 - **Extracción en barra magnética**, basada en el mismo principio que la microextracción en fase sólida, y que consiste en una barra magnética recubierta con material extractante. El espesor del recubrimiento de la barra es mucho mayor que el de la fibra, aumentando de esta manera el área de adsorción y por lo tanto la capacidad del dispositivo.

La **cromatografía** y la **electroforesis** son técnicas separativas empleadas generalmente en la etapa analítica, luego de haber empleado alguno de los procedimientos descritos anteriormente y asociadas a un sistema de medición de la señal del analito, el **detector**. La cromatografía está basada en la diferencia de velocidades de elución de los compuestos a través de un sistema compuesto de una fase estacionaria y una fase móvil. La electroforesis a su vez, se basa en la migración diferencial de los compuestos a través de un campo eléctrico. Existen varios formatos y aplicaciones diferentes para estas técnicas.

Sin embargo, en muestras conformadas por matrices complejas con muchos componentes y donde el analito se encuentra en bajas concentraciones, muchas veces la separación física del mismo es incompleta y no alcanza a aislárselo completamente de las interferencias. Si bien estos procedimientos no dejan de ser sumamente útiles para al menos “limpiar” y muchas veces para preconcentrar al analito, no llegan a lograr completa especificidad.

Actualmente, la **quimiometría** provee de métodos de **separación matemática** o virtual, aplicados en la etapa post-analítica para aislar la **señal neta** o **señal pura** producida por analito en la etapa de medición. Estos métodos, que se describirán más adelante, resultan sumamente ventajosos para alcanzar la especificidad necesaria sin necesidad de aplicar largos y complicados métodos de separación física, muchas veces fuente de errores y variabilidad en los resultados.

1.2.2. Mediciones analíticas

Las técnicas más utilizadas actualmente en la etapa analítica para la determinación de sustancias de interés biológico en muestras de composición compleja son sin dudas, por un lado, las cromatografías líquida y gaseosa y la electroforesis capilar acopladas a diversos tipos de detectores, y por otro, las técnicas bio-analíticas como el ELISA (del inglés *enzyme-linked immunoassays*), el FPIA (del inglés *fluorescent polarization immunoassays*) y los biosensores.

En la presente tesis se hará uso de la **Cromatografía Líquida de Alta Resolución** (CLAR), técnica conocida internacionalmente por su nombre en inglés “**High Performance Liquid Chromatography**” (HPLC), acoplada a detector de arreglo de diodos (DAD) y a detector de fluorescencia de barrido rápido (DF-BR) para la resolución de diversos problemas analíticos.

1.3. Avances y situación actual de la cromatografía líquida

Desde su inserción como técnica analítica en los años 1960, la CLAR ha evolucionado constantemente para lograr cada vez mayor eficiencia, aumentando la selectividad y la velocidad de los análisis. En principio, estos avances se han dado través de la comercialización de partículas cada vez más pequeñas y con soportes de mejor calidad, la introducción de columnas monolíticas de alto rendimiento, la utilización de nuevos instrumentos que trabajan a muy altas presiones y el uso de altas temperaturas en los sistemas tradicionales (Carr y col 2011). Sin dudas, este gran crecimiento se ha dado también de la mano del enorme desarrollo y perfeccionamiento de los *softwares* para la adquisición y procesamiento de datos generados por los cromatógrafos.

En la última década se ha trabajado en la obtención y utilización de **partículas porosas sub-2 μm** , pudiéndose encontrar comercialmente una gran variedad de fases estacionarias en este formato. Estas partículas, empacadas en columnas cortas, proporcionan separaciones de alta eficiencia en muy poco tiempo (Waters Corporation 2004, Swartz 2005, Novàková 2006). La mayor desventaja de estas columnas es que generan presiones que exceden los límites aceptables para los instrumentos convencionales de cromatografía líquida. Para solucionar este inconveniente tuvieron que diseñarse instrumentos capaces de soportar presiones mucho más altas, dando lugar a la aparición de la **“Ultra-high Pressure Liquid Chromatography”** (UPLC) (MacNair y col 1997, MacNair y col 1999, Wu y col 2001). Estos nuevos instrumentos trabajan habitualmente a presiones que superan los 400 bar, siendo capaces de soportar hasta 1000 bar, pero son de costo mucho más elevado que los instrumentos tradicionales.

Otra novedad de los últimos años ha sido la introducción de **partículas “core-shell” sub-3 μm** . Estas partículas, que constan de un núcleo no poroso recubierto de una capa exterior porosa de aproximadamente 0.35 μm , logran una alta eficiencia debido a la mayor velocidad de movimiento del analito en la delgada capa porosa en comparación con las velocidades alcanzadas en las partículas tradicionales completamente porosas. De esta manera, se optimiza la transferencia de masa y a la vez se genera una disminución del volumen muerto, traduciéndose esto en la obtención de bandas mas finas. Las contrapresiones que se generan con estas partículas son comparables a las obtenidas con partículas de 3 μm convencionales, por lo que no se requiere cambio en la instrumentación, más allá de asegurar que el volumen extra-columnar sea lo suficientemente pequeño. El principal inconveniente

de este diseño es que se disminuye ligeramente la capacidad de carga de muestra (Mesa y col 2005 Gritti, G. Guiochon 2010 Fekete y col 2011).

Por otro lado, ha prosperado también el desarrollo de **partículas no-porosas** que, al eliminar totalmente la difusión intra-partícula del analito, proporcionan una transferencia de masa aún mucho más rápida que las *core-shell*. Las partículas de sílica sub-2 μm no porosas han demostrado una gran eficiencia al ser utilizadas a altas presiones en los nuevos instrumentos de UPLC (Patel y col 2004, Malkin y col 2010). Sin embargo, la mayor desventaja es que, al tener un área de intercambio mucho menor en comparación con otros tipos de partículas, las no porosas tienen muy baja capacidad de carga de muestra y poca retención. Los mejores resultados con este tipo de partículas se han obtenido en las separaciones de compuestos de alto peso molecular, especialmente de proteínas (Carr y col 2011).

Aunque las **columnas monolíticas** se comenzaron a utilizar ya en los primeros años de la década de 1970, sólo recientemente se dispone de ellas en forma comercial. Hace más o menos una década se generó una gran expectativa con la aparición de estas columnas que consisten en un lecho poroso formado por diversos materiales poliméricos o sílica. Estas columnas permiten realizar análisis de gran velocidad debido a que la estructura macro-porosa abierta de la fase estacionaria ofrece una alta permeabilidad, pudiéndose utilizar altas velocidades de flujo sin generar contrapresiones altas. Sin embargo, el precio pagado por esta alta permeabilidad es una disminución de las propiedades de transferencia de masa, lo que conduce a una baja eficiencia cuando se utilizan columnas cortas, siendo esta una gran limitación de las columnas monolíticas (Wu y col 2004, Guiochon 2007).

Otra estrategia que se viene utilizando mucho últimamente es el uso de **altas temperaturas**. El aumento de temperatura en la fase móvil reduce la viscosidad y por lo tanto la presión generada, permitiendo que el líquido se mueva más rápido. De esta manera, se logra una mejora en la transferencia de masa, lo que combinado al uso de partículas pequeñas, genera muy buenos resultados. Si bien esta modalidad no requiere de instrumentos de UPLC, si necesita el uso de hornos de columna termostatzados y el precalentamiento de los solventes de la fase móvil a una temperatura cercana a la fijada para la separación. Generalmente, para la aplicación de altas temperaturas se emplean columnas de bajo diámetro, a los fines de conservar una homogeneidad y buena distribución del calor (Thompson y col 2001). Es lógico también, que existan limitaciones instrumentales frente a las altas temperaturas y problemas de estabilidad de las columnas, aunque actualmente se dispone de una cantidad creciente de fases estacionarias térmicamente estables. La

descomposición de los compuestos a analizar es otro factor limitante a tener en cuenta para esta modalidad.

Finalmente, el **análisis quimiométrico** de los datos es una herramienta utilizada cada vez más frecuentemente para mejorar el rendimiento de la cromatografía líquida. Aunque hay muchas maneras diferentes en las que la quimiometría puede interaccionar con la cromatografía, el principal logro de la misma es el de disminuir significativamente los tiempos de análisis. Esto puede lograrse ya sea a través de la **optimización** del sistema de separación empleado o bien reduciendo el nivel de **resolución** necesaria para el obtener resultados de análisis exactos y precisos. Lograr una completa resolución cromatográfica puede ser, para determinados sistemas, muy costoso en términos de tiempos de análisis. Al emplear los nuevos métodos quimiométricos basados en la extracción matemática de la señal pura del analito, la resolución cromatográfica puede reducirse a valores muy bajos, hasta el punto en que ya no se distingan dos picos entre sí ($R < 0.5$). Sin dudas esto se traduce en un drástico aumento de la velocidad de análisis. Una gran ventaja de estas técnicas es que no se necesita de ningún cambio en la instrumentación, pudiéndose aplicar con los instrumentos y columnas convencionales. Lo que sí se requiere es de la adquisición de datos tridimensionales como los generados por los detectores DAD, DF-BR o el detector de espectrometría de masa (MS).

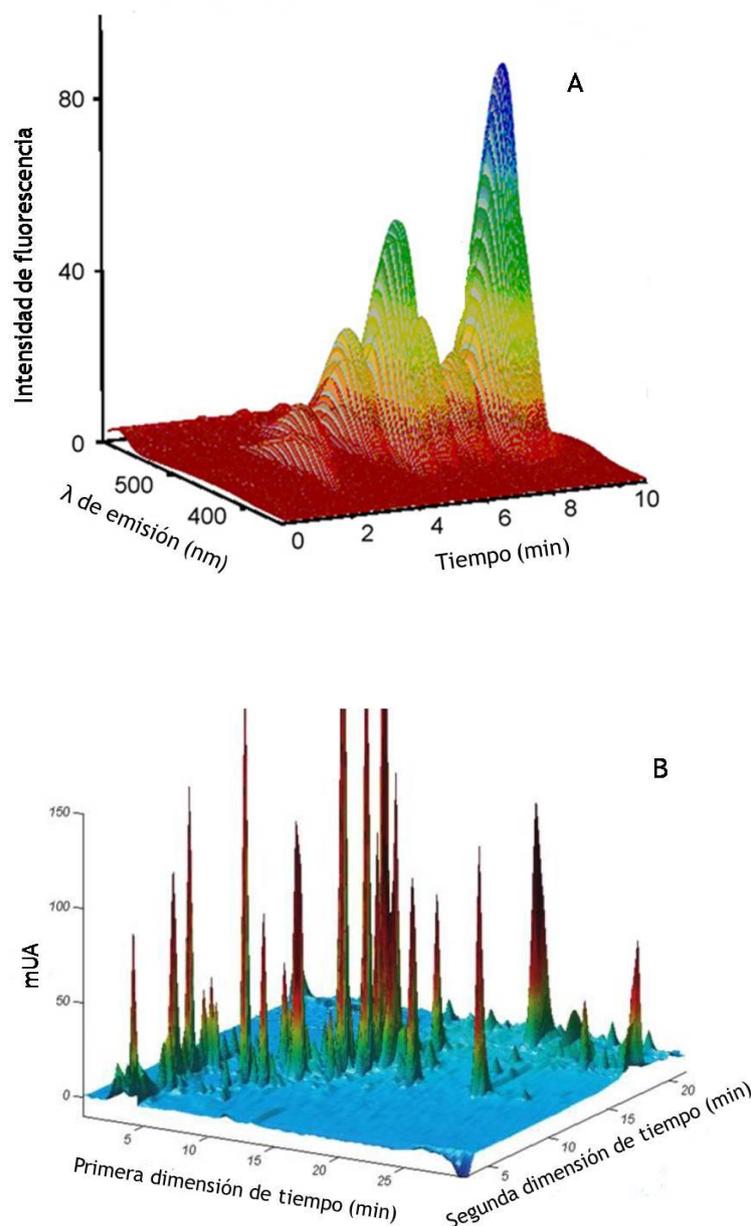
1.4. Tipos de datos adquiridos en cromatografía

En el análisis cromatográfico de una muestra pueden adquirirse y utilizarse diferentes tipos de datos, dependiendo de las posibilidades que brinde el detector acoplado y las pretensiones del analista. Es así que, los datos pueden clasificarse según su **orden**, es decir el número de dimensiones que presentan para una única muestra (Booksh y Kowalski 1994, Escandar y col 2006):

- **Datos de orden cero:** son aquellos que representan una única respuesta por muestra, como por ejemplo cuando del cromatograma obtenido sólo se extrae el valor del área bajo la curva o la altura del pico de interés. Estos datos generan un tensor de orden cero.
- **Datos de primer orden:** son aquellos que representan el cromatograma de una muestra obtenido a una determinada longitud de onda. Estos datos están ordenados en forma de vector o tensor de primer orden.
- **Datos de segundo orden:** son los que se obtienen al utilizar los detectores DAD, DF-BR o MS, registrando los espectros de absorción, de emisión o de masa,

respectivamente para cada tiempo de retención en el cromatograma. También pueden obtenerse datos de segundo orden en las cromatografías bidimensionales (CLAR-2D), en donde hay dos instancias de separación en el tiempo. Con los datos de segundo orden se genera una **matriz de datos** para cada muestra analizada, la cual puede visualizarse como una superficie. En la Figura 1.1 se muestran superficies obtenidas con datos de segundo orden.

Figura 1.1: Superficies obtenidas con datos cromatográficos de segundo orden



A: Separación de fluoroquinonas por CLAR-DF-BR (Cañada-Cañada y col 2009)

B: Separación por CLAR-2D de los constituyentes de extracto acuoso de maíz (Carr y col 2011)

1.5. Quimiometría: Aportes a la cromatografía

La quimiometría es una disciplina científica que comenzó a desarrollarse alrededor del año 1969 y que utiliza métodos matemáticos, estadísticos y otros basados en la lógica, para resolver problemas en el campo de la química y en particular de la química analítica al transformar señales analíticas y datos más o menos complejos en información útil (Massart y col 1997).

Esta disciplina puede dividirse en tres áreas generales (Brereton 1990):

- Extracción de la máxima información química de los datos analíticos
- Optimización de los procedimientos experimentales y mediciones químicas
- Calibración, validación y significancia de las mediciones analíticas

Actualmente se publican numerosos trabajos de química analítica en los que se aplican diferentes herramientas quimiométricas, pertenecientes a alguna de estas tres áreas, para resolver diversos problemas analíticos.

Específicamente la cromatografía puede verse muy beneficiada en su rendimiento al aplicar técnicas quimiométricas. Prueba de ello es, por ejemplo, la aparición reciente en enero de 2011 de un número de la revista *Talanta* titulado “*Enhancing chemical separations with chemometric data analysis*” en donde se presentan y discuten distintas aplicaciones de la quimiometría a datos obtenidos por métodos separativos. Otro ejemplo es la novedosa aparición del término “**cromametría**” para referir a la utilización de técnicas quimiométricas multivariadas para el procesamiento de datos cromatográficos (Van Mospelaar 2005).

De esta manera, combinando los métodos de separación químicos con los quimiométricos se obtienen nuevos métodos de separación muy poderosos y útiles. Estos métodos logran multiplicar la cantidad de información detallada disponible sobre una mezcla compleja y mejorar la calidad de esta información (Synovec 2011).

1.5.1. Aplicaciones

Hay un gran número de posibles aplicaciones de la quimiometría a las separaciones químicas, siendo una de las más utilizadas la de resolver matemáticamente picos solapados, logrando de esta manera una adecuada identificación y cuantificación de los compuestos de interés (Xu y col 2008, Goicoechea y col 2011).

La detección de componentes inesperados en muestras complejas, el efecto matriz y los cambios de la señal analítica debido al pretratamiento de las muestras también pueden resolverse quimiométricamente (Goicoechea y col 2011).

Otras aplicaciones útiles son la de corregir líneas de base, ruidos debidos al gradiente de elución, corrimientos de tiempo de retención y formas de picos (Pravdova y col 2002, van Nederkassel y col 2006, Daszykowski y Walczak 2006, Daszykowski y col 2008, Felinger 2011, Zhang y col 2011, Kuligowski y col 2011) como así también, la transferencia de calibración (Goicoechea y col 2011).

La clasificación de muestras a través del reconocimiento de patrones y la generación de “**huellas dactilares**” es otra aplicación clave de la quimiometría asociada a un perfil cromatográfico (Gong y col 2003 Ni y col 2009, Sinkov y Harynuk 2011).

Finalmente, los métodos quimiométricos se pueden utilizar para comprender mejor los sistemas de separación químicos desde una perspectiva teórica, y para optimizar estas metodologías de separación (Costa Ferreira y col 2007, Dejaegher y Vander Heyden 2009, Breitzkreitz y col 2009, Fourdinier y col 2010).

En la comunidad quimiométrica se espera llegar a obtener una mayor aplicabilidad y aceptación de las técnicas quimiométricas por parte de los analistas en general. Un desafío clave para lograr este propósito es el desarrollo de *softwares* de uso sencillo que permitan hacer de la quimiometría una herramienta de rutina en la práctica diaria, aportando el enorme beneficio que implica su aplicación para mejorar el rendimiento de las separaciones analíticas (Synovec 2011).

1.6. Optimización de métodos cromatográficos

Durante el desarrollo de un método cromatográfico con DAD o DF-BR siempre debe tenerse en cuenta que en el mismo hay muchos y diferentes **factores** que tienen el potencial de afectar el rendimiento y los resultados producidos por el mismo (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: Factores variables de un método cromatográfico

| Componente del sistema cromatográfico | Factor |
|---------------------------------------|---|
| Columna | <ul style="list-style-type: none"> • Tipo de fase estacionaria • Tamaño de partícula • Longitud • Temperatura |
| Fase móvil | <ul style="list-style-type: none"> • Tipo de solvente orgánico • % de solvente orgánico • Componentes del buffer • Concentración de los componentes del buffer • pH del buffer • Tipo de agente de apareamiento iónico • Concentración del agente de apareamiento iónico • Velocidad de flujo |
| Gradiente de elución | <ul style="list-style-type: none"> • Composición inicial de la fase móvil • Etapas del gradiente • Tiempo y composición de cada etapa • Composición final de la fase móvil • Tiempo de estabilización |
| Detector UV-Vis | <ul style="list-style-type: none"> • Longitud de onda de detección • Ancho de banda de detección • Longitud de onda de referencia • Ancho de banda de referencia • Sensibilidad |
| Detector de fluorescencia | <ul style="list-style-type: none"> • Longitud de onda de excitación • Ancho de banda de excitación • Longitud de onda de emisión • Ancho de banda de emisión • Ganancia |

Considerando esta gran cantidad de factores que influyen en el sistema, es habitual que, para el análisis de muestras complejas, se requiera de la aplicación de un procedimiento de optimización para lograr un buen desempeño del método cromatográfico.

El término optimización se utiliza generalmente en química analítica para designar aquellos experimentos que tienen como fin descubrir las condiciones en las cuales debe aplicarse un procedimiento para producir la mejor **respuesta** posible (Aráujo y Brereton 1996). Es decir, consiste en encontrar los valores que debe tomar cada factor para asegurar un buen rendimiento.

Hay más de una estrategia posible a seguir a la hora de optimizar un método cromatográfico, las cuales pueden dividirse en primer lugar entre los procedimientos **univariados** y los **multivariados** (Massart y col 1997).

En los univariados se estudia la influencia de cada factor por separado siguiendo la estrategia conocida popularmente por su nombre en inglés como **“one variable at a time”** (OVAT). Este método consiste en variar los niveles de un único factor por vez, mientras que los demás factores permanecen constantes. En los multivariados se estudian, por el contrario, varios factores simultáneamente variando a la vez los niveles de todos los factores involucrados. Los métodos multivariados son sin dudas mucho más ventajosos que los univariados por las razones que se exponen a continuación (Leardi 2009, Dejaegher y Vander Heyden 2009):

- Permiten conocer a fondo el sistema en estudio.
- Permiten estudiar interacciones entre los factores y relaciones no lineales con las respuestas.
- Reducen dramáticamente el número de experimentos con el consiguiente ahorro en costo, esfuerzo y tiempo invertido en el desarrollo.
- Permite ampliar el **dominio experimental**, es decir la región experimental que debe ser investigada y que está definida por los valores mínimos y máximos de las variables en estudio.
- Generalmente permiten encontrar el óptimo absoluto en el dominio estudiado, mientras que OVAT puede quedar en máximos locales, dependientes de las condiciones iniciales de análisis.

A su vez los métodos multivariados pueden dividirse en aquellos que utilizan estrategias **secuenciales** y los que lo hacen de manera **simultánea** (Dejaegher y Vander Heyden 2009, Walters y col 1991). En una estrategia secuencial se comienza realizando un set de un pequeño número de experimentos y los resultados obtenidos en los mismos se utilizan para definir el nuevo set de experimentos a realizar. La secuencia se repite tantas veces como sea necesario hasta alcanzar las condiciones óptimas buscadas. En una estrategia simultánea, por el contrario, se comienza realizando un número predefinido de experimentos establecidos por medio de un **diseño experimental** (Meyers y Montgomery 2002, Costa Ferreira y col 2007).

La principal diferencia entre la aplicación de un diseño experimental y un método secuencial es que en el primero uno espera encontrar el óptimo dentro del dominio experimental seleccionado, mientras que en el segundo generalmente no se conoce a priori en que entorno puede estar localizado el óptimo. Otra gran diferencia es que los métodos secuenciales permiten la optimización de una sola respuesta,

mientras que el diseño experimental permite optimizar varias respuestas simultáneamente.

En la presente tesis se hizo uso del diseño experimental para optimizar diferentes estrategias analíticas.

1.6.1. Diseño experimental

El diseño de experimentos es la aplicación del método científico para generar conocimiento acerca de un sistema o proceso por medio de pruebas planteadas adecuadamente. Esta metodología se ha ido consolidando como un conjunto de técnicas estadísticas y de ingeniería, que permiten entender mejor situaciones complejas de relación causa-efecto (Gutiérrez Pulido y Salazar 2008). Mediante la elaboración de **modelos matemáticos**, el diseño experimental logra extraer la máxima cantidad de información de los datos con un mínimo número de experimentos (Box y col 2005).

Para llevar a cabo un correcto diseño experimental es necesario considerar las siguientes etapas (Massart y col 1997, Meyers y Montgomery 2002, Mutihac y Mutihac 2008, Leardi 2009, Dejaegher y Vander Heyden 2009):

1. Formular correctamente el problema, definiendo el objetivo de los experimentos. Es decir, establecer claramente y con fundamento que es lo que se quiere optimizar, por ejemplo: la separación cromatográfica, la sensibilidad del método, el tiempo de análisis, etc. En base a este objetivo se elegirán las variables más convenientes a evaluar, por ejemplo: resolución entre picos, área de pico, tiempo de retención, etc. A estas variables, que serán sujeto del procedimiento de optimización se las denomina **respuestas** (variables dependientes).
2. Determinar cuales son los **factores** (variables independientes) que pueden tener un efecto sobre el comportamiento de las respuestas a optimizar. Tal como se vio, el número de factores a considerar cuando se trata de optimizar un método cromatográfico puede llegar a ser muy grande. Es necesario aplicar entonces un mecanismo de selección de factores que permita establecer cuales de todos ellos son los más importantes a tener en cuenta. El mecanismo de selección de factores puede ser básicamente de dos tipos. El primero de ellos es aquel que se basa en conocimientos del sistema, ya sea por fundamentación teórica, experiencias previas o por información recabada en la literatura. Se han desarrollado incluso modelos capaces de predecir los parámetros de retención de compuestos ionizables en función del pH, la composición de la fase móvil y la temperatura (Castells y col 2003,

Castells y col 2004, Gagliardi y col 2005, Gagliardi y col 2006, Agrafiotou y col 2011). La disponibilidad de recursos y el interés particular del analista puede también ser un parámetro de selección. El segundo mecanismo consiste en la aplicación de **diseños de screening** también conocidos como diseños de selección de factores. Dentro de ellos, los diseños Factorial Completo (DFC), Factorial Fraccionado (DFF) y Plackett-Burman en dos niveles para cada factor son muy utilizados en esta etapa porque son muy económicos y eficientes. Estos diseños permiten determinar cuales son, entre todos los factores potencialmente considerables, aquellos que influyen más significativamente en las respuestas calculando el **efecto** de los mismos. El efecto de un factor se define como el cambio en la respuesta producida por un cambio en el nivel del factor y se conoce como efecto principal porque se refiere a los factores de interés fundamentales del experimento. Dependiendo del diseño empleado se pueden determinar también, en algunos casos, los efectos de las interacciones entre dos factores.

Mediante cualquiera de las dos estrategias se logra circunscribir el problema al análisis de un número más reducido de factores, los más significativos, generalmente de dos a cuatro. Los factores que no serán optimizados deben controlarse perfectamente bien y mantenerse siempre en un nivel fijo.

3. Definir el rango en que se estudiará cada factor y el tipo de diseño que se empleará. El **rango** está establecido por los niveles máximos y mínimos a ensayar para cada factor y se selecciona en base al conocimiento previo del sistema, los resultados de los experimentos de selección de factores y fundamentalmente las restricciones de la técnica que se está empleando. Los rangos seleccionados definen el **dominio experimental**. En cuanto al diseño a emplear en esta etapa, el mismo debe seleccionarse entre los **diseños de optimización**, que son aquellos que responden a la **Metodología de la Superficie de Respuesta (MSR)** que se describe en la sección 1.5.1.2.

4. Llevar a cabo los experimentos y obtener las respuestas. Los experimentos que surgen del diseño programado se realizan en una secuencia aleatoria de manera de minimizar el efecto de los factores no controlados. Si el número de experimentos a realizar excede la cantidad posible a realizar durante un mismo día o secuencia de trabajo, los experimentos pueden realizarse en **bloques**, es decir grupos de experimentos que mantienen cierta estructura dentro del diseño. Cada bloque se realiza en una secuencia o día distinto de trabajo. Cuando se trabaja de esta manera es necesario evaluar el efecto del bloqueo al realizar la evaluación de los modelos. Generalmente es también recomendable hacer **réplicas** del punto central y/o de

otros puntos del diseño a los fines de estimar el error o variabilidad de los coeficientes. En esta etapa es sumamente necesario evitar errores experimentales, ya que los mismos pueden anular la validez de los resultados.

5. Analizar los datos obtenidos, construir y evaluar los **modelos**. Después de ejecutar los experimentos y obtener los resultados para las respuestas en estudio, se construye para cada una de ellas un modelo polinomial. Este modelo debe ser capaz de describir la relación entre la respuesta y los factores estudiados. La validez de estos modelos deberá comprobarse estadísticamente como se describe más adelante.

6. Localizar el **óptimo** para la respuesta y determinar cuales son los valores de los factores necesarios para alcanzarlo. La localización del óptimo para una única respuesta, en general no es demasiado complicada y suele lograrse mediante el estudio de las gráficas de contorno o las gráficas tridimensionales de la superficie de respuesta. Sin embargo, cuando se necesita optimizar más de una respuesta simultáneamente debe utilizarse una estrategia de optimización multirespuesta como el uso de la Función Deseabilidad de Derringer que se describe la Sección 1.6.3.

1.6.2. Metodología de la Superficie de Respuesta

La Metodología de la Superficie de Respuesta (MSR), desarrollada por Box y sus colaboradores en la década de 1950, utiliza una serie de técnicas matemáticas y estadísticas para la construcción de un modelo que responde al ajuste de una ecuación polinomial de los datos experimentales (Bruns y col 2006). Este modelo debe ser capaz de describir adecuadamente el comportamiento de dichos datos con el objetivo de realizar predicciones estadísticas. El nombre de la metodología se debe a la perspectiva gráfica que se genera luego del ajuste matemático del modelo.

Cuando una o varias respuestas son dependientes de la influencia de varios factores, esta metodología resulta sumamente útil para lograr la optimización simultánea de los niveles que deben alcanzar estas variables para obtener un rendimiento óptimo del sistema (Becerra y col 2008).

Esta metodología supone estudiar cada factor en tres o más niveles a los fines de modelar la curvatura del sistema y existen varios tipos de diseños distintos para llevarlo a cabo. La elección de uno u otro diseño dependerá básicamente del número de factores a optimizar, del entorno experimental y de la eficiencia y complejidad de cada uno de ellos.

1.6.2.1. Diseños de segundo orden

1.6.2.1.1. Requisitos de los diseños

Los diseños empleados para modelar una superficie de respuesta de segundo orden deben cumplir básicamente con dos requisitos (Myers y Montgomery 2002):

1. Involucrar al menos tres niveles para cada factor (k).
2. Poseer al menos $1+2k+k(k-1)/2$ puntos experimentales que es el número de **coeficientes** del modelo que deberá construirse.

Además de estas condiciones indispensables, las características más buscadas en los diseños experimentales que se emplean en esta metodología son:

- Proporcionar un buen ajuste del modelo a los datos.
- Permitir investigar la idoneidad del modelo matemático, incluyendo la falta de ajuste.
- Proporcionar una estimación de **error puro**.
- Proporcionar una distribución razonable de puntos de datos, y por lo tanto de información, en toda la región de interés.
- No requerir demasiados niveles para cada factor.
- Permitir la realización de experimentos en **bloques**.
- Ser fácil de interpretar y llevar a cabo.
- Asegurar la posibilidad de calcular todos los coeficientes requeridos para el modelo.
- Ser robusto frente a la presencia de resultados anómalos (*outliers*) dentro de los datos.
- Tener **rotabilidad**, es decir la propiedad de predecir las respuestas con una variancia que sea sólo función de la distancia del punto experimental al centro del diseño y no de la dirección.
- No requerir un gran número de experimentos (E).
- Ser eficiente, siendo la **eficiencia** un parámetro del modelo definido por el número de coeficientes estimados dividido el número de experimentos (Ferreira y col 2007).

1.6.2.1.2. Tipos de diseños de optimización. Características

Dentro de los diseños más convenientes para aplicar la Metodología de la Superficie de Respuesta a la optimización de métodos cromatográficos se pueden considerar (Becerra y col 2009, Dejaegher y Vander Heiden 2009):

1. **El Diseño Factorial Completo en tres niveles (3-DFC)**. Consta de tres niveles para cada factor: nivel inferior (-1), nivel intermedio (0) y nivel superior (+1). Cada nivel de un factor se combina en los distintos experimentos con todos los niveles de los otros factores. El número de experimentos está dado por $E=3^k$, por lo que crece exponencialmente con el número de factores. Sólo es conveniente para un número pequeño de factores. Además debe tenerse en cuenta que aunque es sencillo de interpretar, este diseño no admite un dominio experimental muy amplio y no es rotatable.

2. **El Diseño Central Compuesto (DCC)**. Es probablemente, el diseño más utilizado para ajustar superficies de respuesta de segundo orden. En forma genérica un DCC incluye distintas clases de puntos dentro del dominio experimental: **puntos factoriales (pf)**, en niveles (-1) o (+1), **puntos axiales o puntos estrella (pe)**, que tienen todos los factores en el nivel intermedio (0) menos uno de los factores que se encuentra en un nivel axial ($\pm\alpha$) y los **puntos centrales (pc)**, que tienen todos los factores en nivel intermedio. Generalmente se hacen réplicas de este punto para obtener la estimación del error. El número de experiencias es $E=2^k+2k+pc$. De acuerdo a lo previamente dicho, se puede ver que cada factor se encuentra en cinco niveles posibles: $-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$ y cuando α toma el valor de la raíz cuarta de f , siendo f el número de puntos factoriales, se dice que el diseño es **rotatable**.

3. **El Diseño de Box-Behnken (DBB)**. Es una opción eficiente cuando se requiere estudiar los factores en tres niveles, en el cual los puntos experimentales están localizados en los puntos medios de las aristas de un cubo y en el centro (pc). Igual que en DCC el punto central generalmente se replica para estimar el error. Es un diseño de naturaleza esférica y rotatable y el número de experiencias está dado por: $E=2k(k-1)+pc$. Puede verse que la eficiencia de este diseño se basa en que, a diferencia de los anteriores diseños, el crecimiento de E es proporcional a k y no exponencial.

4. **La Matriz de Doehlert (DMD)**. En este diseño los experimentos están definidos de tal manera que se logra una distribución perfectamente homogénea en el espacio experimental, es decir que la distancia entre dos experimentos vecinos es siempre la misma. DMD para dos factores consiste en un hexágono de seis vértices con puntos centrales, mientras que para tres factores se convierte en un dodecaedro centrado.

Para lograr esta propiedad, el número de niveles no es el mismo para cada factor. Por ejemplo, para dos variables una de ellas se estudia a cinco niveles y la otra a tres. Esta característica permite una libre elección de asignar más o menos niveles a cada variable en particular, sin embargo para un número mayor de factores puede resultar difícil de realizar y de interpretar. El número de experiencias está dado por: $E = k^2 + k + pc$.

5. **Diseños de Mezclas (DM).** Estos diseños deben utilizarse cuando los factores a optimizar son interdependientes, como es, por ejemplo, el caso de la proporción de solventes en la fase móvil. El diseño simplex de Snyder y Kirkland es el más empleado en estos casos (Breitkreitz y col 2009).

1.6.2.2. Construcción de los modelos

Utilizando los resultados obtenidos para las respuestas en los experimentos de optimización se construye, en principio, un modelo de segundo orden que incluye una ordenada al origen (término constante), los efectos principales (términos lineales), los efectos de segundo orden (términos cuadráticos) y los efectos de las interacciones. La Ecuación 1.1 describe en forma general estos modelos.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (1.1)$$

Donde β_0 es la ordenada al origen, β_i , β_{ii} y β_{ij} representan a los coeficientes de los términos de primer orden, los términos cuadráticos y las interacciones respectivamente. ε es el error residual asociado a los experimentos y k es el número de factores.

Usualmente sólo se tienen en cuenta las interacciones de segundo orden ($x_i x_j$) ya que las de orden superior no suelen resultar significativas y, dependiendo del diseño utilizado, pueden estar confundidas con los efectos principales.

1.6.2.3. Evaluación de los modelos

La significancia de los términos del modelo debe evaluarse estadísticamente mediante ANOVA, para lo cual hay más de una estrategia posible a seguir, siendo las más utilizadas la eliminación por retroceso o la inclusión progresiva de términos. Generalmente los términos que resultan no significativos en el modelo son eliminados del mismo para obtener el modelo más simple que describa el sistema. La regresión y la falta de ajuste del modelo resultante, incluyendo los términos significativos y los

necesarios para mantener la jerarquía, se evalúan también mediante ANOVA. El modelo construido se considera adecuado cuando la regresión resulta significativa y la falta de ajuste no significativa para el nivel de confianza seleccionado.

Otro parámetro a tener en cuenta en la evolución del modelo es el coeficiente de determinación r^2 que representa el porcentaje de variancia explicada por el modelo.

1.6.2.4. Localización del óptimo

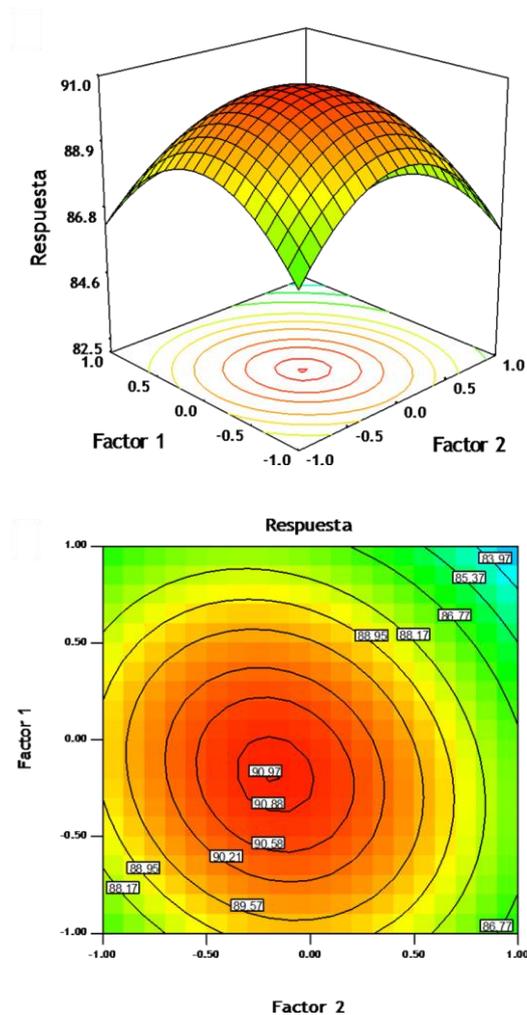
El modelo construido y validado se utiliza finalmente para predecir el óptimo buscado para la respuesta en función de los niveles de los factores. Una forma muy práctica de hallarlo es a través de la representación gráfica del modelo. Para ello pueden obtenerse dos tipos de gráficas muy útiles:

1. La superficie de respuesta en el espacio tridimensional
2. La gráfica de contornos que resulta de la proyección de la superficie en un plano, representada como líneas de respuesta constante. Cada contorno corresponde a una altura específica de dicha superficie.

El valor óptimo buscado puede corresponder, de acuerdo al criterio de optimización establecido, a un punto máximo de la superficie, un punto mínimo, o un valor establecido.

En la Figura 1.2 se muestra una superficie de respuesta y su gráfica de contorno. Como puede verse, en estas gráficas se representa la respuesta en función de dos factores estudiados. Cuando se han estudiado más de dos factores, aquellos que no están graficados deben establecerse en un valor constante. Cuando se deben analizar más de dos factores para una respuesta o dos respuestas en función de dos factores, la superposición de las gráficas de contorno puede ser una forma sencilla para encontrar el óptimo buscado.

Figura 1.2: Superficie de respuesta y gráfica de contorno



1.6.3. Optimización multirespuesta. Función Deseabilidad de Derringer

Cuando el procedimiento de optimización involucra más de una respuesta, no es posible optimizar cada una de ellas por separado porque se obtendrían tantas soluciones diferentes como respuestas en estudio. En la optimización de un proceso o de un método analítico, la solución debe ser la misma para todas las respuestas. Esta solución debe contemplar un cierto grado de cumplimiento de los criterios propuestos para todas y cada una de las respuestas que involucran un buen rendimiento del método; es decir debe hallarse una solución de compromiso.

Superponer las gráficas de contorno de la optimización de cada respuesta individual permite estimar las soluciones, siempre y cuando el número de respuestas y de factores no sea muy grande. Cuando el número de respuestas es igual o mayor a tres o existen muchos factores, la metodología de la gráfica de contorno no se puede

aplicar. Por lo tanto, es fundamental encontrar la manera de transformar un problema multi-respuesta en un uno de respuesta única.

Derringer y Suich, en 1980, encontraron una solución a este problema desarrollando la función **Deseabilidad** (Derringer y Suich 1980), que se utiliza ampliamente desde entonces en la industria para la optimización de procesos con respuestas múltiples. La función Deseabilidad se basa en la idea de que la calidad de un producto o proceso que tiene múltiples características, es completamente inaceptable si una de ellas se encuentra fuera de algún límite “deseable”. Su objetivo es encontrar condiciones operativas que aseguren el cumplimiento de los criterios de todas las respuestas en juego y, a la vez, provean el mejor valor en conjunto de respuesta deseable (Meyers y Montgomery 2002).

Para lograr esto se debe obtener, en primer lugar, una función deseabilidad para cada respuesta estableciendo el criterio de optimización para la misma y utilizando el modelo matemático ajustado que la relaciona a las variables del sistema.

En segundo lugar se deben combinar estas funciones individuales en una única función global que logre encontrar la mejor respuesta conjunta.

1.6.3.1. Deseabilidad individual

Para cada respuesta a optimizar $y_i(\mathbf{k})$ se debe calcular una función deseabilidad individual $d_i(y_i)$. Esta función siempre toma valores entre 0 y 1, donde para cualquier valor no deseable de la respuesta $d_i(y_i)=0$; mientras que $d_i(y_i)=1$ representa un valor completamente deseable, es decir una respuesta ideal. Los valores intermedios de $d_i(y_i)$ representan a respuestas aceptables más o menos deseable.

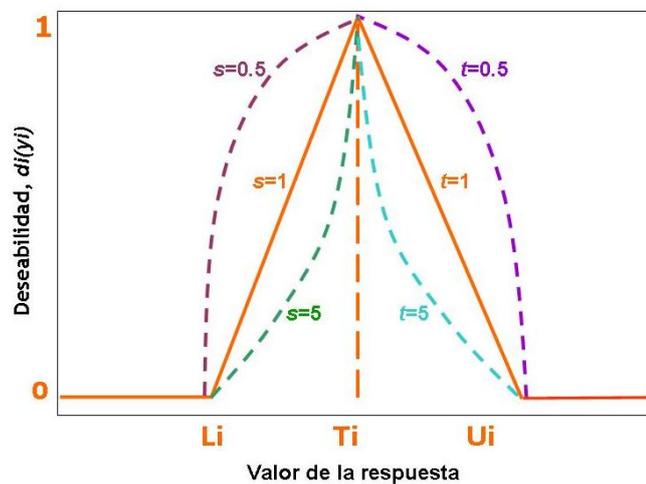
Dependiendo del criterio de optimización para cada respuesta, pueden usarse diferentes $d_i(y_i)$. Derringer y Suich denominaron L_i (del inglés, *lower*), U_i (del inglés, *upper*) y T_i (del inglés, *target*) a los valores bajo, alto y un valor fijo respectivamente, de respuestas deseadas. Estos valores se eligen de acuerdo a las necesidades o prioridades del investigador.

Cuando el criterio de optimización es el de ajustar la respuesta a un valor T_i , la función deseabilidad toma la siguiente forma:

$$d_i(\hat{Y}_i(x)) = \begin{cases} 0 & \text{si } \hat{Y}_i(x) \leq L_i \\ \left(\frac{\hat{Y}_i(x) - L_i}{T_i - L_i} \right)^s & \text{si } L_i < \hat{Y}_i(x) < T_i \\ 1 & \text{si } \hat{Y}_i(x) = T_i \\ \left(\frac{\hat{Y}_i(x) - U_i}{T_i - U_i} \right)^t & \text{si } T_i < \hat{Y}_i(x) < U_i \\ 0 & \text{si } \hat{Y}_i(x) \geq U_i \end{cases} \quad (1.2)$$

donde los exponentes s y t se denominan **pesos** y permiten cambiarle la forma a cada función deseabilidad individual. Los pesos se utilizan para darle énfasis a los criterios. Cuando el peso es 1, la función $d_i(y_i)$ varía entre 0 y 1 linealmente. Pesos mayores a 1 (hasta un máximo de 10) le otorgan más énfasis al criterio establecido, mientras que pesos menores a 1 (hasta un mínimo de 0.1) le dan menos peso al criterio. En la Figura 1.3 se representa un esquema de las distintas curvaturas que puede seguir la función $d_i(y_i)$ cuando se busca optimizar una respuesta en un valor fijo T_i .

Figura 1.3: Función deseabilidad para un valor fijo



En otras palabras, si el criterio de optimización establecido debe ser muy estricto se utiliza un valor de s o t grande. Se puede observar que, para esos valores, la pendiente de la curva de $d_i(y_i)$ en las proximidades del valor T_i es muy pronunciada, por lo que, con pequeños cambios o alejamientos del valor óptimo, la función $d_i(y_i)$ disminuye de manera considerable. En caso contrario, cuando el

criterio de optimización no es tan estricto, se puede utilizar un valor de s o t pequeño. Conforme se aleja la respuesta del valor fijo, la función $d_i(y_i)$ no varía de manera considerable.

Cuando el criterio de optimización es maximizar la respuesta, $d_i(y_i)$ está definida como:

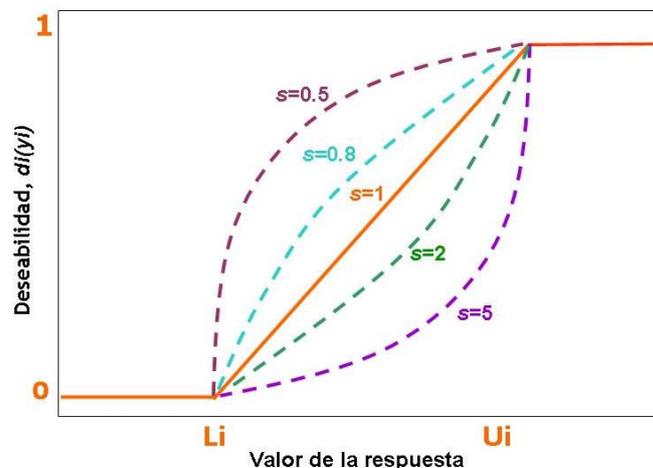
$$d_i(\hat{Y}_i(x)) = \begin{cases} 0 & \text{si } \hat{Y}_i(x) < L_i \\ \left(\frac{\hat{Y}_i(x) - L_i}{U_i - L_i} \right)^s & \text{si } L_i \leq \hat{Y}_i(x) \leq U_i \\ 1 & \text{si } \hat{Y}_i(x) > U_i \end{cases} \quad (1.3)$$

Finalmente, si el criterio es minimizar la respuesta se debe usar:

$$d_i(\hat{Y}_i(x)) = \begin{cases} 1 & \text{si } \hat{Y}_i(x) < L_i \\ \left(\frac{U_i - \hat{Y}_i(x)}{U_i - L_i} \right)^s & \text{si } L_i \leq \hat{Y}_i(x) \leq U_i \\ 0 & \text{si } \hat{Y}_i(x) > U_i \end{cases} \quad (1.4)$$

La Figura 1.4 muestra un esquema de las curvas de $d_i(y_i)$ cuando se quiere maximizar una función utilizando diferentes pesos. El gráfico resulta inverso cuando se quiere minimizar la función.

Figura 1.4: Función deseabilidad para un valor máximo



1.6.3.2. Deseabilidad global

Finalmente las deseabilidades individuales se combinan generando la función deseabilidad global (D) de acuerdo con la Ecuación 1.2.

$$D = \left(d_1^{r_1} x d_2^{r_2} x \dots x d_n^{r_n} \right)^{\frac{1}{\sum r_i}} = \left(\prod_{i=1}^n d_i^{r_i} \right)^{\frac{1}{\sum r_i}} \quad (1.5)$$

donde n es el número de respuestas en estudio y r_n es la **importancia relativa** de cada respuesta en relación a las otras. La importancia puede variar desde 1 para la variable menos importante hasta 5 para la más importante de todas.

Un valor de D entre 0 y 1 implica que todas las respuestas poseen simultáneamente un valor deseable, mientras que, si alguna de las respuestas es completamente indeseable, la deseabilidad de esa respuesta $d_i(\mathbf{y}_i)$ será igual a cero y, por lo tanto, la función D será nula.

Habiendo especificado todos los criterios de optimización para las respuestas, se generarán las coordenadas de las variables independientes donde la función D toma su mayor valor. Es importante aclarar que en todos los puntos donde D es distinta de cero, se cumplen **todos** los criterios especificados, en mayor o en menor medida. Los valores de D se calculan con las $d_i(\mathbf{y}_i)$ de las respuestas estimadas por los modelos ajustados para un alto número de combinaciones de niveles de los factores. Generalmente esta función encuentra una o más de una zona de condiciones óptimas, en donde los valores de D son aceptables. Es decir, más de una combinación de factores satisfacen en mayor o menor grado todos los requisitos en forma simultánea. En estos casos podemos decir que la optimización ha generado una solución robusta (Karatapanis y col 2011).

1.7. Pretratamiento de señales

La calidad de los cromatogramas obtenidos para la realización de un análisis químico es fundamental para determinar la validez de los resultados generados por los mismos. No es extraño que el procesamiento de muestras complejas genere cromatogramas con mucha señal de línea de base, debido a la contribución de componentes de la matriz de la muestra que no han podido ser eliminados en los pasos de pretratamiento. Otro inconveniente que suele presentarse en estas situaciones, es el corrimiento de los tiempos de retención de los picos de los analitos

de interés, lo que para algunos métodos de calibración multivariada representa un gran inconveniente.

La quimiometría provee de mecanismos para corregir o mejorar las señales a través de la utilización de algoritmos de preprocesamiento, proporcionando de esta manera predicciones analíticas de mejor calidad.

Es así que, el rendimiento de la cromatografía puede incrementarse, por ejemplo, eliminando el ruido y la señal de la línea de base, lo que supone reducir la complejidad de los datos y el aporte a la señal total de los componentes inesperados de las muestras (Daszykowski y Walczak 2006). De esta manera se limpia, aunque no siempre totalmente, la señal del analito consiguiendo así un aumento en sensibilidad y selectividad.

La calidad de los datos de segundo orden se ve fundamentalmente muy beneficiada por la utilización de pretratamiento de señales, logrando de esta manera un mejor rendimiento de los algoritmos de segundo orden (Braga y col 2007, Bortolato y col 2009, Cañada-Cañada y col 2009, Martinez Galera y col 2010).

Varios investigadores han desarrollado algoritmos útiles para el pretratamiento de señales a los fines de corregir la línea de base, dentro de los cuales vale la pena destacar (Goicoechea y col 2011):

- **Cecil y Rutan:** nuevo método que incluye la sustracción de la señal de fondo basado en los algoritmos de Kalman, la corrección de corrimientos y el análisis de regresión lineal para respuestas superpuestas.
- **Brereton:** algoritmo basado en el análisis de congruencia para revelar la presencia de un fondo espectral constante y el ajuste por cuadrados mínimos de las regiones de “cero componentes” mediante la extracción de componentes principales para la estimación de la línea de base. Finalmente se obtiene un cromatograma corregido por sustracción del fondo y la línea de base estimados a partir de los datos originales.
- **Eilers:** mecanismo muy útil para el tratamiento de señales de segundo orden basado en un método de cuadrados mínimos asimétricos.
- **István:** método de la sustracción objetiva del espectro del solvente, con muy buenos resultados para la corrección de matrices de datos provenientes de cromatografías isocráticas acopladas a detector de absorción infrarroja.
- **Quintás y sus colaboradores:** métodos uni y multivariados para sustraer la contribución del solvente en sistemas de flujo continuo tanto en condiciones isocráticas, como de gradiente para datos de absorción infrarroja.
- **Ramis-Ramos y sus colaboradores:** método automatizado de corrección de fondo y análisis multivariado de datos provenientes de electroferogramas.

- **Baek** y sus colaboradores: método sencillo para la eliminación del fondo proveniente al espectro Raman, basado en la detección de pico, suavizado e interpolación para determinar la señal de fondo.
- **Yu** y sus colaboradores: nueva técnica para remover el fondo y el corrimiento en datos provenientes de cromatografía líquida bidimensional acoplada a DAD.

El algoritmo de Eilers se empleó en el presente trabajo de tesis para corregir la línea de base de cromatogramas de muestras ambientales y biológicas.

1.7.1. El algoritmo de Eilers

El algoritmo de Eilers, uno de los más utilizados en la actualidad, ha sido recientemente adaptado para la aplicación a datos multidimensionales (Eilers 2004, Eilers y col 2006). Consiste en la estimación de una matriz de fondo F ($J \times K$) a partir de la matriz original de datos M ($J \times K$), en donde J es el número de longitudes de onda registradas y K es el número de tiempos de retención en los que se han registrado los espectros. Para lograr este objetivo, se utiliza una matriz de base curva $B1$ ($L \times J$) a lo largo de las filas de la matriz M y una matriz de base curva $B2$ ($M \times K$) a lo largo de las columnas de la matriz M . Generalmente se utilizan 10 funciones base para generar estas matrices, por lo que $L = M = 10$ (Kaczmarek y col 2005). F se puede representar como:

$$f_{j,k} = \sum_{L,M} b1_{Lj} b2_{MK} a_{LM} \quad (1.6)$$

en donde a_{LM} es el elemento (L,M) de una matriz A que contiene los coeficientes de regresión, los cuales se pueden calcular a través de la minimización de la siguiente función costo:

$$Q = \sum_{L,M} v_{JK} (y_{JK} - f_{JK})^2 + P \quad (1.7)$$

donde y es la señal experimental, f es una tendencia del ruido (la aproximación de la línea de base) y v son los pesos anteriores. Los elementos de v deberían tener valores grandes en las partes de la señal en donde está permitido afectar la estimación de la línea de base. Si se considera la siguiente elección de pesos asimétricos:

$$v_{JK} = p \text{ si } v_{JK} > f_{JK} \text{ y } v_{JK} = 1-p \text{ si } v_{JK} \leq f_{JK} \quad \text{para } 0 < p < 1$$

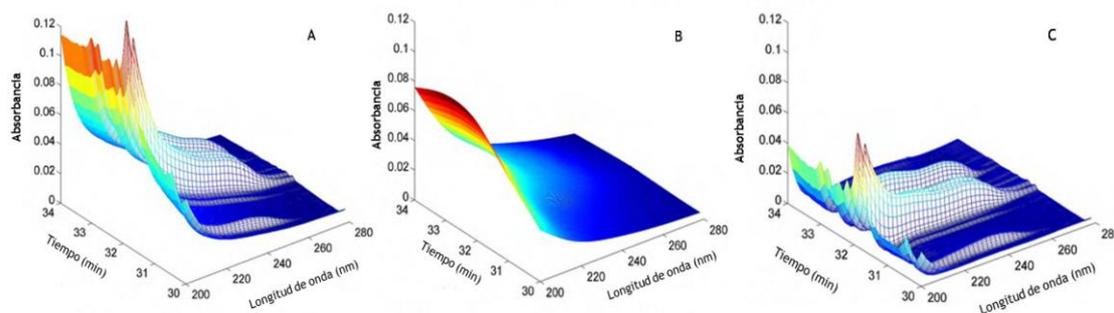
se observa que desviaciones positivas de la tendencia resultarán en pesos diferentes de los residuos negativos. La experiencia muestra que comenzar a partir de ν aproximadamente igual a 1, e iterar entre dos cómputos, conduce de manera rápida y confiable a una solución en aproximadamente 10 iteraciones. Finalmente, en la Ecuación 1.7 hay un término de penalización definido por:

$$P = \lambda \left[\sum_L (\Delta_1^d \mathbf{a}_L)^2 + \sum_L (\Delta_2^d \mathbf{a}_M)^2 \right] \quad (1.8)$$

en donde Δ_1 y Δ_2 son diferencias de orden d calculadas para cada columna de \mathbf{A} (\mathbf{a}_L) y cada fila de \mathbf{A} (\mathbf{a}_M), respectivamente. Como se puede observar en la Ecuación 1.8, si se usan valores diferentes para el parámetro de regularización λ , la penalización podría tener diferente influencia en las direcciones verticales y horizontales.

Finalmente sustrayendo la matriz \mathbf{F} a la matriz \mathbf{M} se obtiene una matriz \mathbf{C} corregida. En la Figura 1.5 se puede ver la aplicación del algoritmo de Eilers a la corrección de la línea de base de un cromatograma correspondiente a la separación de fármacos en agua de río (Goicoechea y col 2011).

Figura 1.5: Corrección de línea de base



- A: Matriz \mathbf{M} representando los datos originales
- B: Matriz \mathbf{F} representando el fondo estimado por el algoritmo
- C: Matriz \mathbf{C} corregida

1.8. Pureza de pico

La alta selectividad que puede lograrse en la cromatografía líquida proporciona generalmente buenas separaciones en muestras de baja o mediana complejidad. Sin embargo, como se discutió anteriormente, este objetivo no siempre es fácil de lograr en muestras complejas o cuando se necesita priorizar la velocidad del análisis y/o un bajo consumo de solventes. En estos casos, no es raro que los picos de los analitos de interés se superpongan entre sí o coeluyan con compuestos de la matriz. Se dice en esta situación que el pico obtenido no es puro.

Como se mencionó, la CLAR asociada a DAD o DF-BR proporciona una matriz de datos para cada muestra. En estas matrices las columnas corresponden a los cromatogramas generados a distintas longitudes de onda, mientras que las filas corresponden a espectros tomados a distintos tiempos de retención. Cuando un pico es puro no deberían encontrarse diferencias en los perfiles espectrales ni cromatográficos del mismo, más allá de los cambios en intensidad. En cambio, cuando más de un compuesto eluye al mismo tiempo se generan en la matriz filas que contienen combinaciones lineales de los espectros puros de los compuestos y columnas con combinaciones de los perfiles cromatográficos puros (Garrido Frenich y col 1999).

La manera tradicional de detectar picos impuros es la evaluación visual de los cromatogramas buscando la presencia de hombros, valles o asimetrías en los picos. Todas estas situaciones pueden indicar la existencia de un pico solapado. Sin embargo, la ausencia de estos artefactos no asegura la pureza del pico de interés. Si la resolución cromatográfica es muy baja o si la impureza está en muy baja concentración, la misma no podrá detectarse con una simple inspección visual. Se debe recurrir entonces, a procedimientos de evaluación más confiables, como los que proporciona la quimiometría.

Existen distintos métodos quimiométricos para la determinación de la pureza de un pico, los cuales pueden clasificarse básicamente en dos categorías (Garrido Frenich y col 1999, De Braekeleer y col 2000):

1. Aquellos que se basan en la comparación de las filas o de las columnas de la matriz de datos con un perfil (espectro o cromatograma) de referencia. Los *softwares* de procesamientos de datos de los instrumentos modernos traen incorporados algunos de estos algoritmos que permiten evaluar de una manera sencilla la pureza de los picos durante el desarrollo del método cromatográfico. Ejemplos de ellos son:

- a. La comparación visual por superposición de espectros y/o cromatogramas **normalizados o derivados** en distintos ordenes.
 - b. **Sustracción espectral**, en donde la señal resultante de la sustracción de los espectros normalizados a un espectro de referencia, se compara con el ruido instrumental.
 - c. **Homogeneidad de pico**, basado en la comparación de relación de absorbancia de los espectros de un pico a dos longitudes de onda (Gergely y col 1999).
 - d. **Índice de pureza**, basado en el cálculo de la desviación estándar de la *longitud de onda central* de cada espectro registrado en un pico (Dionex 2000, Wiberg y col 2004).
 - e. **SIMPLISMA** (del inglés, *simple-to-use interactive self-modeling mixture analysis*), algoritmo iterativo que selecciona el *espectro mas puro* y grafica un *cromatograma de pureza*. La iteración se repite hasta extraer todos los perfiles puros, es decir el número de componentes del pico (De Braekeleer y Massart 1997).
 - f. **OPA** (del inglés, *ortogonal projection aproach*), compara los espectros normalizados del pico con el espectro promedio o con un espectro estándar que debe suministrarse al algoritmo, y determina el número de componentes (Cuesta Sánchez y col 1996).
 - g. **Correlación espectral**, calculando un **factor de pureza**, llamado también **factor de similitud** que comparado con el nivel de ruido permite determinar la presencia de impurezas (Sthal 2003, Agilent Technologies 2008).
2. Aquellos que se basan en el análisis de componentes principales, van más allá de la determinación de pureza de un pico, ya que tienen como objetivo principal la obtención del número de componentes presentes. Si bien son en general muy sensibles, son más complejos de interpretar, ya que no extraen información de perfiles espectrales o cromatográficos. No son empleados habitualmente por los *softwares* comerciales, ejemplos de ellos son:
- a. **EFA** (del inglés, *evolving factor analysis*).
 - b. **FSW-EFA** (del inglés, *fixed-size moving window evolving factor analysis*)
 - c. **ETA** (del inglés, *eigenstructure tracking analysis*)
 - d. **HELP** (del inglés, *heuristic evolving latent projections*)
 - e. **NS** (del inglés, *needle search*)

Es importante destacar que la sensibilidad de las metodologías para determinar pureza de pico o número de componentes es diferente para cada

algoritmo y fundamentalmente dependiente del grado de diferencia espectral de la impureza con el analito. Las impurezas con alta similitud espectral con el analito serán detectadas sólo si están presentes en concentraciones elevada, mientras que los isómeros no pueden ser detectados por estos algoritmos (Gergely y col 1999). Por lo mencionado, estos métodos son muy útiles para detectar picos impuros, pero no pueden confirmar categóricamente la pureza absoluta de un pico.

Los estudios de pureza de pico se realizaron en la presente tesis por el método de la correlación espectral.

1.8.1. Correlación espectral

La obtención de un **factor de correlación** espectral es una forma sencilla y muy útil de calcular la similitud entre dos espectros. Esta correlación puede hacerse, por ejemplo, entre el espectro promedio del pico del analito obtenido en la solución muestra y el espectro promedio del mismo pico obtenido en la solución estándar, estrategia que sirve, a la vez, para identificar fehacientemente al analito en una muestra desconocida. Cuando la correlación se hace entre espectros de un mismo pico proporciona una medida de la pureza del pico. En este caso el espectro de referencia puede tomarse como el espectro promedio de todos los espectros del pico, o ir tomando distintos espectros de referencia a distintos tiempos y hacer luego una evaluación global.

Para obtener el factor de correlación espectral deben seguirse ciertos pasos:

1. **Corrección de fondo:** la señal causada por la fase móvil o componentes de la matriz debe eliminarse por sustracción de un espectro de referencia apropiado. El espectro de los solventes de la fase móvil puede ser obtenido, para una cromatografía isocrática, en un tiempo inmediatamente posterior al tiempo muerto (t_0). Para un sistema de gradientes, donde la contribución espectral de la fase móvil varía en el tiempo, o cuando se tiene señal de la matriz, el espectro de referencia deberá elegirse en un tiempo inmediatamente anterior o posterior al pico de interés, siempre y cuando haya buena resolución de línea de base.
2. **Selección del rango espectral,** de manera que sólo se tengan en cuenta las contribuciones significativas del analito, y no aquellas que provean demasiado ruido, como por ejemplo las longitudes de onda cortas.
3. **Selección de los espectros** para la evaluación, ya que puede trabajarse con todos los espectros registrados dentro del pico o con algunos de ellos siempre y cuando se incluya información de todas las regiones del pico (frontal, ápice y cola). Fijar un

umbral de absorbancia es una buena medida para eliminar los espectros del comienzo y la última porción del pico que introducen demasiado ruido.

4. **Normalización de los espectros**, para igualar la contribución de todos los espectros del pico registrados a los distintos tiempos de retención.

5. **Transformación de la señal**, es un paso no obligatorio pero que puede realizarse para mejorar la calidad de la señal al trabajar con algoritmos de suavizado, el logaritmo natural o derivadas de distintos ordenes de la señal.

6. **Selección del espectro de referencia**.

Finalmente, con las señales procesadas se obtiene el factor de correlación (F_c) entre los espectros como un ajuste de cuadrados mínimos de todas las absorbancias obtenidas a una misma longitud de onda mediante la siguiente fórmula:

$$F_c = \frac{\left[\frac{\sum_{i=1}^{i=n} [(A_i - \bar{A}) \times (B_i - \bar{B})]}{i} \right]^2}{\left[\sum_{i=1}^{i=n} (A_i - \bar{A})^2 \times \sum_{i=1}^{i=n} (B_i - \bar{B})^2 \right]} \quad (1.9)$$

donde A_i y B_i son las medidas de absorbancia a una misma longitud de onda en el primer y segundo espectro respectivamente y n es el número de longitudes de onda analizadas.

Generalmente este factor se informa de manera porcentual, por lo que un F_c igual a cero indica que los espectros son totalmente distintos, mientras que valores cercanos a 100 indican alta correlación espectral.

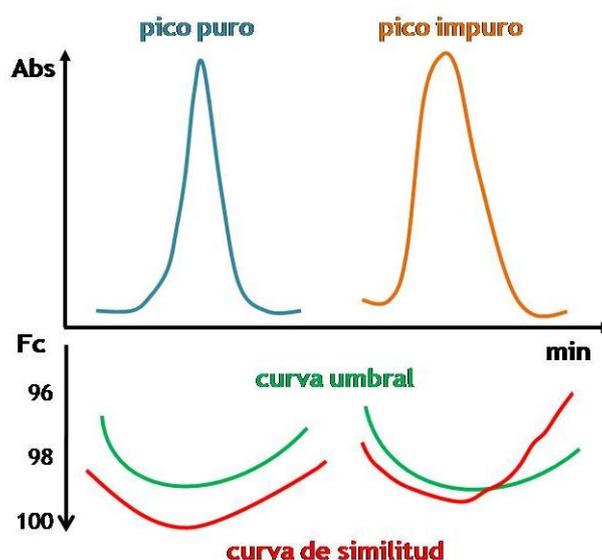
1.8.2. Factor de pureza y curva de similitud

El **factor de pureza**, un índice muy utilizado en cromatografía, se obtiene como un promedio de todos los factores de correlación obtenidos para los distintos espectros dentro del pico.

Los factores de correlación también pueden graficarse en función del tiempo de retención obteniéndose de esta manera una **curva de similitud**, cuyo perfil ideal es el de una línea recta en 100 %. Sin embargo, lo habitual es que la línea se curve en los extremos debido a la disminución de la relación señal/ruido en la primera y última porción del pico. Para determinar la contribución del ruido a la curva de similitud, es útil obtener una **curva umbral** que considere el efecto del ruido en la correlación espectral, para lo cual se obtienen los factores de correlación sin realizar

la corrección de fondo. Ambas curvas pueden representarse en una misma gráfica obteniéndose una **gráfica de pureza de pico**. Si la curva de similitud queda por arriba de la curva umbral a lo largo de todo el pico, significa que no se han detectado impurezas y que las variaciones espectrales son sólo atribuibles al ruido instrumental. Si en cambio existe una impureza solapada, la curva de similitud cruza a la curva umbral en algún tramo del pico. En la Figura 1.6 se muestra una gráfica de pureza de pico para ambas situaciones.

Figura 1.6: Gráfica de pureza de pico



1.9. Calibración

La calibración es la caracterización de la respuesta de un instrumento en función de las propiedades de un analito o un grupo de ellos. Se basa en el establecimiento de una relación inequívoca entre la señal y la concentración de la sustancia en estudio (Valcarcel 1999).

A la hora de establecer esta **relación inequívoca** en cromatografía para sistemas complejos, pueden surgir diferentes inconvenientes dependiendo del problema analítico a resolver, de la muestra, del procedimiento de pretratamiento utilizado y/o del rendimiento instrumental. En la Tabla 1.2 se muestran los inconvenientes más frecuentes y las estrategias de calibración que pueden aplicarse para solucionarlos (Cuadros-Rodríguez y col 2001, Ramis-Ramos y García Álvarez-Coque, 2001, Goicoechea y Olivieri 2007).

Tabla 1.2: Estrategias de calibración

| Inconveniente | Calibración |
|---|--|
| Concentraciones muy variables del analito | <ul style="list-style-type: none"> • Calibración con curva |
| Recuperaciones variables | <ul style="list-style-type: none"> • Calibración con estándar interno |
| Efecto matriz | <ul style="list-style-type: none"> • Calibración en matriz • Calibración interna |
| Interferencias | <ul style="list-style-type: none"> • Calibración multivariada |

Es así, que la calibración puede clasificarse de acuerdo a distintos criterios:

1. Por la cantidad de niveles de concentración de los estándares usados:
 - Calibración en un nivel
 - Calibración con curva
2. Por la forma de preparar los estándares:
 - Calibración externa, que a su vez puede ser:
 - Calibración en solvente
 - Calibración en matriz
 - Calibración interna, más conocida como **adición de estándar**
3. Por el tipo de estándares utilizados:
 - Calibración con estándar del analito
 - Calibración con estándar interno
4. Por la estructura de los datos y tipos de algoritmos utilizados:
 - Calibración univariada
 - Calibración multivariada

La calibración en un nivel es el modo más sencillo de caracterizar un sistema y se aplica, generalmente, cuando la concentración esperable del analito se encuentra acotada a un rango estrecho, como por ejemplo, en el control de calidad de preparaciones farmacéuticas. En cambio, cuando deben analizarse muestras biológicas como suero, plasma, orina o tejidos para la determinación de fármacos o metabolitos, las concentraciones esperables del analito suelen variar dentro de un rango muy amplio. Estas situaciones pueden darse también en el análisis de muestras medioambientales o de residuos en alimentos. En estos casos es necesario disponer de un modelo de calibración capaz de predecir con exactitud y precisión

concentraciones muy diferentes del analito. La **curva de calibrado**, ajustada con un adecuado modelo de regresión, es muy útil en estas situaciones.

Los procedimientos de pretratamiento de muestra pueden acarrear problemas tales como recuperaciones bajas o muy variables, lo que se traduce en falta de exactitud y o precisión en el método si es que no se soluciona el inconveniente. Una forma de hacerlo es mediante la realización de una calibración con estándar interno. En este tipo de calibración se le agrega tanto a la muestra, como a las soluciones de estándar específico, una sustancia químicamente semejante al analito denominada **estándar interno**. La muestra adicionada se somete a todo el procedimiento analítico y esta manera el estándar interno recibe el mismo tratamiento que el analito. La respuesta (área o altura de pico) del analito se normaliza en relación a la respuesta del estándar interno en cada solución calibradora o muestra y se independiza de esta manera del efecto del pretratamiento. La calibración con estándar interno puede ser útil también para minimizar los efectos de la falta de repetibilidad instrumental. Aunque hoy en día este problema es muy poco frecuente en los modernos cromatógrafos líquidos, especialmente si se trabaja con inyector automático, sigue siendo una estrategia muy válida en cromatografía gaseosa (GC) o en electroforesis capilar (EC).

Otro tipo de problemas que pueden surgir en la calibración es la existencia de interacciones del analito con el entorno en el que se encuentra en la solución muestra. Estas interacciones pueden producir exaltaciones o inhibiciones de la señal del analito, proporcionales a su concentración, lo que se conoce como **efecto matriz**. Este inconveniente, que suele detectarse por falta de exactitud en los ensayos de recuperación en varios niveles, sólo puede solucionarse generando calibradores que reproduzcan el entorno del analito en la muestra. Esto puede lograrse mediante dos estrategias. La primera de ella es la calibración en matriz, que puede realizarse cuando se dispone de una matriz blanco de la muestra, como por ejemplo el plasma u orina de un paciente no tratado con el fármaco que se quiere determinar, un alimento sin fortificar o una formulación farmacéutica preparada intencionalmente sin el principio activo. Cuando no es posible obtener una matriz blanco, como por ejemplo, en el estudio de metabolitos endógenos, o de muestras medio ambientales, el otro recurso es el de la calibración interna. Esta denominación se utiliza para distinguirla de la calibración externa en la que los patrones se preparan en soluciones independientes a las de la muestra. En la calibración interna se determina la señal del analito en la muestra original y en alícuotas de la muestra a las que se les adiciona una o varias concentraciones de un estándar del analito.

Finalmente, la existencia de interferencias que no pueden ser separadas cromatográficamente hace necesaria la calibración multivariada, que no se diferencia de la univariada en la forma de preparación de los estándares, sino en los algoritmos aplicados para la resolución del problema, como se verá más adelante.

Si bien cada tipo de calibración es capaz de resolver un problema en particular, también es necesario contemplar los requerimientos que se deben cumplir para poder aplicarlas (Tabla 1.3).

Tabla 1.3: Requerimiento de las diferentes estrategias de calibración

| Tipo de calibración | Requerimientos |
|--------------------------------------|--|
| Calibración en solvente | <ul style="list-style-type: none"> • Ausencia de efecto matriz |
| Calibración en matriz | <ul style="list-style-type: none"> • Disponibilidad de matriz blanco |
| Calibración interna | <ul style="list-style-type: none"> • Disponibilidad de cantidad suficiente de muestra |
| Calibración con estándar del analito | <ul style="list-style-type: none"> • Repetibilidad instrumental • Recuperaciones no diferentes significativamente de 100% y con buena precisión |
| Calibración con estándar interno | <ul style="list-style-type: none"> • Disponibilidad de una sustancia químicamente semejante al analito y que se resuelva bien del mismo |
| Calibración en un nivel | <ul style="list-style-type: none"> • Rango acotado de concentración esperable de analito en las muestras • Validación de la linealidad en el rango esperado • Ordenada al origen estadísticamente no diferente de cero. |
| Calibración con curva | <ul style="list-style-type: none"> • Ajuste a un modelo de regresión |
| Calibración univariada | <ul style="list-style-type: none"> • Selectividad demostrada para el analito |
| Calibración multivariada | <ul style="list-style-type: none"> • Disponibilidad de datos de segundo orden y de algoritmos adecuados para su procesamiento |

Es importante destacar que las diferentes estrategias de calibración pueden combinarse entre si para obtener, por ejemplo, un modelo de calibración univariado en matriz con estándar interno, o un modelo de calibración interna multivariado.

Las consideraciones más importantes de los modelos de calibración utilizados en la presente tesis se mencionan a continuación.

1.9.1. Calibración univariada por regresión lineal simple

La calibración univariada puede aplicarse siempre y cuando se haya demostrado en los estudios de selectividad que la señal medida es específica del analito y no existen interferencias. Los datos que se utilizan en esta calibración son siempre de orden cero y el conjunto de calibración es un tensor de orden cero.

La construcción de un modelo de regresión lineal simple ajustado por el método de los cuadrados mínimos es la forma más frecuente de obtener una curva de calibración univariada (Danzer y Currie 1998, Miller y Miller 2002, Goicoechea y Olivieri 2007).

Usualmente en este modo de calibración se preparan soluciones estándares, llamadas también calibradores, en cinco o seis niveles de concentración (p) por triplicado, de manera que se obtienen 15 o 18 puntos de calibración (m) y se mide la señal del analito en las mismas. El análisis de los datos de calibrado mediante regresión lineal implica el cálculo de la pendiente (A) y ordenada al origen (B) de la recta ajustada a la ecuación $y = A x + B$. Los valores estimados de A y B se calculan mediante las siguientes ecuaciones:

$$A = \frac{Q_{xy}}{Q_{xx}} = \frac{\sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})^2} \quad (1.10)$$

$$B = \bar{y} - A\bar{x} \quad (1.11)$$

donde x_i es la concentración de cada uno de los m calibradores, \bar{x} es el promedio de las concentraciones de calibrado, y_i es la respuesta en cada punto e \bar{y} es el promedio de las respuestas de los calibradores. Las desviaciones estándar de A y B son parámetros que deben ser evaluados y se calculan con las siguientes ecuaciones:

$$s_A = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{Q_{xx}}} \quad (1.12)$$

$$s_B = s_{y/x} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{x^2}{Q_{xx}}} \quad (1.13)$$

donde $s_{y/x}$ es la desviación estándar de los residuos de la regresión que está dada por:

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (y_i - \hat{y}_i)^2}{m-2}} \quad (1.14)$$

donde y_i es la respuesta experimental de cada calibrador e \hat{y}_i representa la respuesta estimada en cada punto, es decir, $\hat{y}_i = A x_i + B$. Se emplean $m-2$ grados de libertad, ya que hay m datos disponibles y 2 parámetros estimados en la regresión (A y B).

En el método de calibración interna, el modelo de regresión es el mismo que en método de calibración externa, sólo que las predicciones se realizan de otra manera. Mientras que en la calibración externa se utiliza la ecuación de la recta para predecir distintas muestras, en la calibración interna el valor predicho para la muestra es el punto de corte entre la recta de regresión extrapolada y la abscisa.

1.9.1.1. Evaluación del modelo

Una manera conveniente de medir el ajuste de los datos de calibración al modelo lineal simple es a través de la relación que existe entre la variancia de la regresión y la variancia del ruido instrumental. Si la primera es significativamente mayor que la segunda se supone que hay causas de desvío de la ley lineal que son estadísticamente superiores al ruido en la respuesta. La prueba estadística que se utiliza para determinar la falta de ajuste al modelo lineal es la prueba F de una cola, en la que se calcula un valor "experimental" de F , dado por:

$$F_{\text{exp}} = \frac{(s_{y/x})^2}{(s_y)^2} \quad (1.15)$$

donde s_y es el ruido instrumental dado por:

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^r (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{m-p}} \quad (1.16)$$

donde p es el número de niveles de concentración estudiados, r es el número de réplicas en cada punto, y_{ij} es la respuesta correspondiente a cada punto en el nivel i

y la réplica j , y \bar{y}_i es el promedio de las respuestas de las réplicas para un mismo nivel.

El valor calculado de F se compara con el valor F crítico de tablas para $m-2$ y $m-p$ grados de libertad, y un determinado nivel de confianza, por ejemplo 95%. Si $F_{\text{exp}} < F_{\text{crit}}$, se acepta que los datos se comportan linealmente.

Para que esta prueba F sea válida es necesario corroborar con anterioridad que se verifiquen dos condiciones. Una de ellas es que los errores en las concentraciones de los calibradores sean menores que los errores de las respuestas, lo que debe asegurarse preparando soluciones estándares con muy poca incertidumbre. En segundo lugar, debe cumplirse que haya **homocedasticidad** de los datos, lo que puede verificarse mediante otra prueba F para comparación de las varianzas de los niveles extremos del rango de calibración. Si estas varianzas son comparables se acepta que los datos son homocedásticos.

También es muy útil para la verificación del ajuste al modelo lineal realizar una inspección visual de la gráfica de distribución de los residuos en función de los niveles de calibración. Una distribución aleatoria de los residuos en torno a cero indica homocedasticidad de los mismos. Por otro lado, esta gráfica también es útil para detectar puntos anómalos y puntos niveladores, así como tendencias de distribución que indican falta de linealidad.

En caso de heterocedasticidad de los residuos no puede aplicarse la regresión lineal simple y deberá recurrirse a una transformación matemática de los datos o a una ponderación de los puntos experimentales.

También es interesante destacar que el coeficiente de correlación r es, en realidad, una medida de la relación entre dos variables azarosas y no tiene ningún significado en la calibración analítica, ya que en esta instancia las variables no son azarosas, sino que están intencionalmente correlacionadas. Sin embargo, r^2 conocido como coeficiente de determinación, sigue informándose como un parámetro de la regresión por cuadrados mínimos que indica el porcentaje de varianza total de los datos explicado por el modelo.

1.9.1.2. Cifras de mérito

Las cifras de mérito de un método analítico son aquellos parámetros que lo califican y permiten la comparación de sus propiedades con las de otro método.

Las cifras de mérito obtenidas en la calibración son:

- La **sensibilidad de calibración** (*SEN*) que es igual a la pendiente de la recta de calibrado:

$$SEN = A \quad (1.17)$$

- La **sensibilidad analítica** (γ), y su inversa ($1/\gamma$) que tiene unidades de concentración y mayor significado y utilidad que *SEN*, ya que permite la comparación con métodos obtenidos por otras técnicas:

$$\gamma = SEN/s_y \quad (1.18)$$

- El **límite de detección**, **LOD** (del inglés, *limit of detection*) definido como la mínima concentración detectable de manera confiable:

$$LOD = 3.3 s_0 \quad (1.19)$$

donde s_0 es la desviación de la concentración predicha para el blanco

- El **límite de cuantificación**, **LOQ** (del inglés, *limit of quantification*) definido como la mínima concentración cuantificable de manera confiable:

$$LOQ = 10 s_0 \quad (1.20)$$

- El **rango lineal** que comprende desde el LOQ hasta la mayor concentración en la que se verifica linealidad. Muchas veces no es necesario evaluar todo el rango lineal y la calibración se realiza en un rango útil más acotado conocido como **rango de calibración**.

1.9.1.3. Comparación de pendientes

El efecto matriz produce un cambio en la señal del analito proporcional a la concentración del mismo, de manera que se produce un cambio en la pendiente de la curva de calibrado en matriz respecto a la pendiente de la misma curva en solvente. Una forma de verificar si existe efecto matriz es comprobar si el cambio de pendiente es estadísticamente significativo, para lo cual puede aplicarse una prueba *t* (Massart y col 1997) donde:

$$t = \frac{B_1 - B_2}{\sqrt{(s_{B_1})^2 + (s_{B_2})^2}} \quad (1.21)$$

y comparar la *t* calculada con la *t* de tablas para (m_1+m_2-2) grados de libertad y un determinado nivel de confianza.

1.9.2. Calibración multivariada

La calibración multivariada se aplica cuando no se ha logrado una señal completamente específica del analito, sea por solapamiento de dos o más picos de interés, o por la presencia de interferencias. A su vez, la calibración multivariada puede ser de primer orden cuando se utilizan datos ordenados en vectores, o de segundo orden cuando se utilizan matrices de datos. Si bien en otras técnicas se han logrado arreglos de datos de órdenes superiores, como por ejemplo el seguimiento en el tiempo de la cinética de una reacción con matrices de excitación-emisión (Arancibia y col 2006), en cromatografía líquida aun no se ha explorado esta posibilidad. Cuando los datos que se obtienen por muestra están ordenados en dos o más dimensiones se dice que se tiene un arreglo multivía.

1.9.2.1. Algoritmos de calibración de primer orden

Los algoritmos de calibración de primer orden más utilizados para sistemas lineales son **PCR** (del inglés, *principal component regression*) y **PLS** (del inglés, *partial least-squares*) (Martens y Naes 1989).

Los calibradores que se preparan en este modo de calibración deben cumplir dos condiciones: contener una concentración exacta del o los analitos y contener todas las especies esperadas en las muestras. Se dice entonces que en estos modelos los analitos están calibrados y las interferencias están modeladas pero no calibradas (Escandar y col 2007).

El principal logro de estos algoritmos es el de compensar la falta de selectividad extrayendo la señal pura del o los analitos calibrados a partir de la señal analítica total. Así, al predecir las muestras se relaciona la señal pura extraída por el algoritmo con la concentración del analito. Si en las muestras analizadas aparecen nuevas especies, no esperadas y que por lo tanto no fueron modeladas en la calibración, el modelo detectará un residuo extremadamente grande que permitirá catalogar a la muestra como anómala y la concentración del analito no podrá ser predicha en la misma. Esta capacidad de los algoritmos de primer orden de cuantificar analitos en presencia de otras sustancias que producen señal analítica y de detectar la aparición de interferencias no modeladas se denomina **ventaja de primer orden** (Booksh y Kowalski 1994).

Se dispone también de algoritmos de calibración de primer orden para sistemas no lineales, como por ejemplo los distintos tipos de redes neuronales artificiales conocidas como **ANNs** (del inglés, *artificial neural network*).

PLS se ha aplicado a la resolución de impurezas en fármacos en el modo cromatográfico y en el modo espectral (Zisis y col 1999). Sin embargo, la posibilidad de obtener en CLAR acoplada a DAD o DF-BR, datos de segundo orden, que proveen de mayor información, ha llevado a que los algoritmos de primer orden prácticamente no se hayan aplicado a la calibración utilizando datos cromatográficos.

1.9.2.2. Algoritmos de calibración de segundo orden

Los algoritmos de calibración de segundo orden son muy variados y están actualmente en continua expansión y mejora. Entre ellos podemos mencionar como los más utilizados a:

- **PARAFAC** (del inglés, *parallel factor analysis*), (Bro 1997).
- **GRAM** (del inglés, *generalized rank annihilation method*), (Sanchez y Kowalski 1986).
- **DTLD** (del inglés, *direct trilinear decomposition*), (Sanchez y Kowalski 1990).
- **MCR -ALS** (del inglés, *multivariate curve resolution-alternating least squares*), (De Juan y col 2000).
- **BLLS** (del inglés, *bilinear least squares*), (Linder y Sundberg 1998, Linder y Sundberg 2002).
- **ATLD** (del inglés, *alternating trilinear decomposition*), (Wu y col 1998) y sus variantes:
 - **SWATLD** (del inglés, *self-weighted alternating trilinear decomposition*) (Chen y col 2000)
 - **APTLD** (del inglés, *alternating penalty trilinear decomposition*), (Hu y col 2006, Xia y col 2005).

A diferencia de la calibración de primer orden, en este caso se puede calibrar sólo con estándares de los analitos, sin necesidad de modelar ningún otro componente de la muestra.

El gran aporte de estos algoritmos de calibración es la capacidad de extraer la señal pura del o los analitos a partir de la señal analítica total en presencia de

sustancias no modeladas, para poder cuantificarlos con exactitud. Esta característica se conoce como **ventaja de segundo orden** (Booksh y Kowalski 1994).

Esta ventaja de segundo orden se alcanza introduciendo, de alguna manera, información de la muestra en la etapa de calibración.

De los algoritmos mencionados, en el presente trabajo de tesis se estudiaron las capacidades del algoritmo MCR-ALS para resolver sistemas experimentales con datos de segundo orden en muestras ambientales y biológicas.

1.9.2.3. Vectorización de datos de segundo orden

Una alternativa para trabajar con datos de segundo orden es reordenar los datos en vectores y aplicar metodologías de primer orden, por ejemplo, a través de **U-PCR** (del inglés, *unfolded-principal component regression*) o **U-PLS** (del inglés, *unfolded-partial least square*) (Wold y col 1987). Estos algoritmos se usaron antes de que aparezcan los métodos genuinos de segundo orden como **N-PLS** (Bro 1996). Sin embargo, ninguno de ellos presenta la ventaja de segundo orden, a menos que se los acople a un procedimiento separado de bilinealización residual, **RBL** (del inglés, *residual bilinearization*) (Öhman y col 1990a).

En la presente tesis se evaluó el rendimiento del algoritmo cuadrados mínimos parciales desdoblados seguidos de bilinealización residual, **U-PLS/RBL** (Olivieri 2005), que presenta las capacidades de las metodologías basadas en factores latentes preservando la ventaja de segundo orden.

1.9.2.4. Estructura y arreglo de los datos de segundo orden

El conjunto de datos producido por un componente puro en ausencia de ruido puede definirse como una matriz **Z** ($K \times J$), la que a su vez puede expresarse como el producto interno de dos vectores

$$\mathbf{Z} = \mathbf{x} \mathbf{y}^T \quad (1.22)$$

en donde \mathbf{x} ($J \times 1$) e \mathbf{y} ($K \times 1$) denotan los perfiles en una y otra dimensión, por ejemplo: longitud de onda y tiempo de retención en cromatografía.

Idealmente, los perfiles de \mathbf{x} e \mathbf{y} son independientes uno de otro y en ese caso se dice que hay **bilinealidad** es decir, \mathbf{x} es lineal para un valor fijo de \mathbf{y} , y viceversa (Escandar y col 2007).

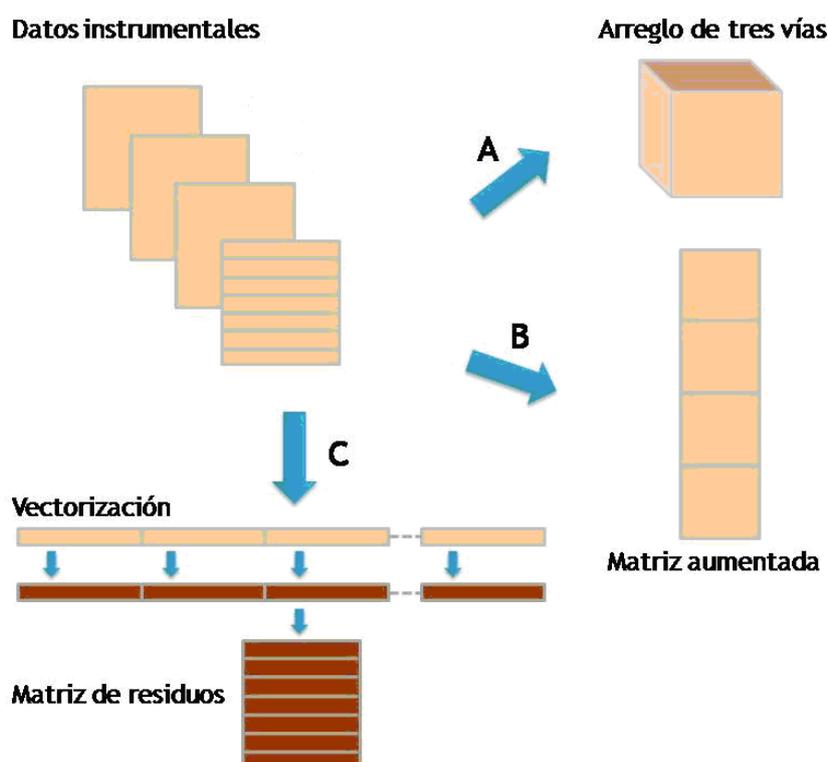
Para crear un modelo de calibración de segundo orden las matrices de datos de muestras y calibradores deben ordenarse en **arreglos de datos**. Los arreglos para

aplicar algoritmos que proporcionen la ventaja de segundo orden a sistemas lineales pueden ser (Gomez y Callao 2008, Goicoechea y col 2011):

- a. Arreglos de tres vías, como los que se utilizan en PARAFAC, PARAFAC2, GRAM, DTLD, APTLD, SWATLD y N-PLS
- b. Matriz aumentada, como en el caso de MCR-ALS
- c. Combinación de vectores de residuos obtenidos al aplicar algoritmos de primer orden a datos vectorizados, como en el caso de BLLS y U-PLS/RBL

En la Figura 1.7 se esquematizan los distintos tipos de arreglo de datos de segundo orden.

Figura 1.7: Arreglos de datos de segundo orden



Cuando las I matrices de datos bilineales, correspondientes a un conjunto de calibración, con las señales de un componente, se agrupan en un arreglo de tres vías, el arreglo se puede expresar como:

$$M_{ijk} = x_i y_j z_k \quad (1.23)$$

donde M_{ijk} es un elemento del arreglo \underline{M} de tres vías de tamaño $(I \times J \times K)$ y x_i , y_j y z_k son los elementos de los perfiles de una dimensión x , y y z que describen el

comportamiento de la señal medida en cada una de las dimensiones de los datos. Cuando se cumple esta condición, se dice que en el arreglo de datos hay **trilinealidad**, indicando que existe una relación interna entre cada una de las matrices y que, en general, la descomposición de estos arreglos es única (Escandar y col 2007, Bro 1998).

1.9.2.5. MCR-ALS

MCR-ALS es un algoritmo que posee la capacidad de procesar múltiples matrices de datos simultáneamente reduciendo ambigüedades intrínsecas del análisis de factores y/o **deficiencias de rango** presentes en los datos. Una matriz es deficiente de rango cuando el número de especies químicas detectadas por los métodos de análisis de factores, como por ejemplo SVD (del inglés, *singular value decomposition*), es menor al número real de componentes químicos presentes en el sistema, lo cual puede deberse a similitudes muy marcadas entre las repuestas o los perfiles de los mismos (Ruckebusch y col 2006).

Por otra parte, este algoritmo permite la aplicación flexible de diversas **restricciones**, interaccionando de este modo con el modelo, para llegar a una mejor resolución del problema (Jaumot y col 2005).

Finalmente, MCR-ALS es capaz de procesar datos que se desvían de la trilinealidad. Esto se logra creando una matriz aumentada **D** alineando las matrices de datos en el sentido en que se sospecha pérdida de trilinealidad. Es decir, si se presentan variaciones en los tiempos de retención, el aumento debería realizarse en la dimensión temporal, mientras que si las variaciones se observan en los espectros, convendrá obtener la matriz aumentada en esta dimensión, sin embargo, esta última situación no es probable de encontrar en cromatografía. En todos los casos, la matriz aumentada debe incluir las matrices de los calibradores y de la muestra a predecir (De Juan y col 2000).

La descomposición bilineal de la matriz aumentada **D** se realiza de acuerdo al siguiente modelo:

$$\mathbf{D} = \mathbf{C} \times \mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad (1.24)$$

donde **C** y **S** contienen los perfiles de las especies en una y otra dimensión y **E** es una matriz de residuos no ajustados por el modelo.

El modo más habitual de obtener **D** para resolver picos cromatográficos solapados o con interferencias que coeluyen con el analito, es aumentando **D** en la

dimensión temporal, es decir, apilando las matrices una arriba de la otra, con lo que se obtiene:

$$\mathbf{D}_t = \mathbf{C}_t \times \mathbf{S}_t^T + \mathbf{E}_t \quad (1.25)$$

donde el subíndice t indica el aumento en la dimensión temporal. En este caso las filas de \mathbf{D}_t contienen los espectros de absorción o de emisión medidos para diferentes muestras a diferentes tiempos de retención, las columnas de \mathbf{C}_t contienen los perfiles temporales, es decir los cromatogramas de las especies y las filas de \mathbf{S}_t^T sus espectros relacionados. Al perfil temporal \mathbf{C}_t se lo denomina en este caso **perfil de concentración**, ya que contiene la señal dependiente de la concentración de las especies y puede utilizarse para su cuantificación. Al perfil espectral \mathbf{S}_t^T se lo denomina **perfil de señales puras**, ya que contiene los espectros puros de cada especie y puede utilizarse para identificarlas (Azzouz y Tauler 2008).

Considerando el caso en que las matrices de datos, \mathbf{M}_i tienen dimensiones ($K \times J$), donde J es el número de longitudes de onda registradas y K es el número de sensores para el tiempo de retención, y se construye \mathbf{D} con I matrices de calibración y una matriz de muestra que contiene N componentes que contribuyen a la señal analítica, se deben obtener las siguientes dimensiones para las matrices: \mathbf{D}_t ($K(1 + I) \times J$), \mathbf{C}_t ($K(1 + I) \times N$), \mathbf{S}_t^T ($N \times J$) y \mathbf{E}_t ($K(1 + I) \times J$).

La descomposición de \mathbf{D}_t para obtener \mathbf{C}_t y \mathbf{S}_t^T se logra a través de la minimización por cuadrados mínimos alternantes de la norma de \mathbf{E}_t . Esta minimización comienza con la provisión de **estimaciones iniciales**, es decir, información estimada de los componentes de la muestra, la cual deben ser lo más cercana posible a lo real. Así, en el modo de aumento de \mathbf{D} en el sentido temporal se deben suministrar los espectros puros de las especies presentes a modo de estimaciones iniciales. Estos espectros pueden ser obtenidos a partir de cromatogramas de estándares o pueden ser extraídos a partir de SIMPLISMA, algoritmo que logra extraer los espectros “más puros” de la matriz de datos (Windig y Guilment 1991). También puede utilizarse una combinación de ambas estrategias incorporando la información de los estándares de los analitos y extrayendo los perfiles de las interferencias del análisis espectral. Con la información suministrada como \mathbf{S}_t se estima la matriz $\hat{\mathbf{C}}_t$ a partir de:

$$\hat{\mathbf{C}}_t = \mathbf{D}_t^T (\mathbf{S}_t^+)^T \quad (1.26)$$

en donde “+” indica la inversa generalizada.

Con la matriz $\hat{\mathbf{C}}_t$ de la Ecuación 1.26 y la matriz de datos original \mathbf{D} se vuelve a estimar la matriz \mathbf{S}_t mediante cuadrados mínimos:

$$\hat{\mathbf{S}}_t = \mathbf{D}_t (\hat{\mathbf{C}}_t^T)^+ \quad (1.27)$$

y finalmente se calcula E_t a partir de la Ecuación 1.25 usando D_t y las matrices estimadas \hat{C}_t y \hat{S}_t . Estos pasos se repiten en forma iterativa hasta alcanzar la convergencia imponiendo ciertas restricciones adecuadas al sistema en estudio durante el proceso de ALS.

Entre las restricciones más aplicadas se encuentran (Muñoz y De Juan 2007, De Juan y Tauler 2003, Jaumot y col 2005):

- **No negatividad:** evita la presencia de valores negativos en los perfiles. Esta restricción se aplica a los perfiles de concentración y a espectros de absorbancia y/o de fluorescencia, ya que se espera que sus valores sean siempre positivos.
- **Unimodalidad:** fuerza la presencia de un único máximo en el perfil de una especie. Se aplica a procesos en donde los perfiles dependientes de la concentración muestran una forma de aparición-decaimiento (en cromatografía se espera que los picos se presenten como un único pico por especie).
- **Clausura (cierre o balance de masa):** se relaciona con ecuaciones de balance de masa en sistemas cerrados. Se aplica cuando la concentración total de las especies detectables en cada etapa del proceso es constante, pudiéndose fijar a un valor único o variable. Esta restricción no puede aplicarse en cromatografía ya que especies analizadas no forman un sistema cerrado.
- **Rango local/selectividad:** impone la ausencia de algunas especies en un rango específico de perfiles dependientes de concentración, por ejemplo, en una cierta ventana de tiempo.
- **Igualdad:** se puede introducir en la optimización información química asociada al conocimiento de los perfiles puros de concentración o espectros. Los perfiles conocidos pueden ser establecidos como invariantes durante el proceso iterativo.
- **Modelado rígido:** se aplica cuando se conoce la ley química (cinética o termodinámica) asociada a un proceso particular. Los perfiles de concentración asociados a componentes en el proceso se fuerzan a presentar la forma descrita por la ley química. Esta restricción no es aplicable en cromatografía.
- **Trilinealidad:** es la restricción de tres vías más esencial ya que, cuando es aplicable, asegura que los resultados sean únicos; es decir, que los perfiles resueltos no tengan ambigüedad.

Finalmente, la resolución satisfactoria de MCR-ALS se logra incluyendo información de la correspondencia entre especies en cada matriz, a través de una matriz binaria que indica si un dado componente existe o no en la matriz de datos (Ruckebush y col 2006).

El aumento de \mathbf{D} en el modo temporal sólo puede hacerse en cromatografía cuando los espectros de las especies presentes son lo suficientemente diferentes para poder resolverse. En el caso de solapamiento espectral extremo la inversa generalizada requerida en la Ecuación 1.26 se vuelve inestable. Una alternativa para resolver este problema es realizar el aumento en el modo espectral. En este caso, la estrategia consiste en transponer las matrices de datos antes de ubicarlas una arriba de la otra para obtener \mathbf{D} . Al realizar el ajuste por cuadrados mínimos se tiene:

$$\mathbf{D}_e = \mathbf{S}_e \times \mathbf{C}_e^T + \mathbf{E}_e \quad (1.28)$$

$$\hat{\mathbf{S}}_e = \mathbf{D}_e (\hat{\mathbf{C}}_e^T)^+ \quad (1.29)$$

$$\hat{\mathbf{C}}_e = (\hat{\mathbf{S}}_e^+ \times \mathbf{D}_e)^T \quad (1.30)$$

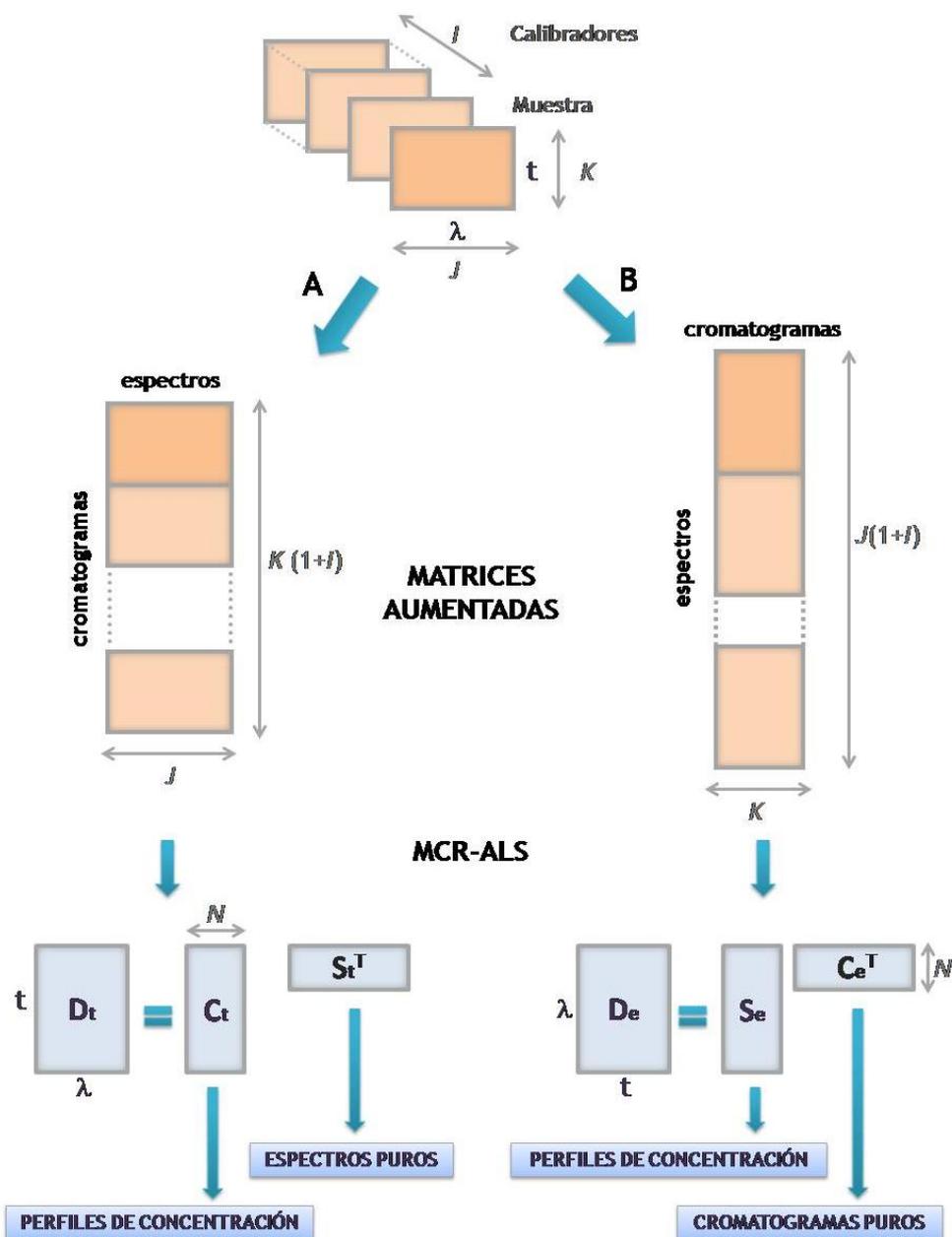
en donde el subíndice e indica el aumento de \mathbf{D} en la dimensión espectral y los tamaños de las matrices involucradas ahora son: \mathbf{D}_e ($J(1 + I) \times K$), \mathbf{S}_e ($J(1 + I) \times N$), \mathbf{C}_e^T ($N \times K$) y \mathbf{E}_e ($J(1 + I) \times K$).

En este modo particular de aumento, la inversa generalizada de $\hat{\mathbf{C}}_e$ en la Ecuación 1.29 puede ser obtenida siempre que los perfiles temporales de los componentes de la muestra sean diferentes, es decir que no haya un solapamiento total de los picos. Otra condición importante en este caso es que no haya pérdida de trilinealidad, es decir, que no se observen ni corrimientos ni deformaciones de los picos. De esta forma, la inversa generalizada de \mathbf{S}_e puede ser obtenida de manera confiable debido a que el aumento de la matriz rompe la dependencia lineal de los perfiles espectrales individuales. Esto se debe al hecho de que la matriz espectral \mathbf{S}_e ahora tiene ($J(1 + I) \times N$) elementos en lugar de los ($N \times J$) correspondientes al aumento en el modo temporal. Cada columna de \mathbf{S}_e consiste en ($1 + I$) vectores sucesivos de tamaño ($J \times 1$), cada uno de ellos teniendo la forma de un espectro de un componente particular, con una intensidad proporcional a su concentración en una dada muestra. Por lo tanto, las columnas de \mathbf{S}_e no son más linealmente dependientes.

Luego de la descomposición de \mathbf{D}_e mediante MCR-ALS, la información de concentración estará ahora contenida en \mathbf{S}_e y puede ser utilizada para realizar predicciones cuantitativas.

En la Figura 1.8 se representan las dos formas de obtener \mathbf{D} y de realizar su descomposición para obtener los perfiles puros y los perfiles de concentración de los componentes de la muestra.

Figura 1.8: Obtención de matrices aumentadas en MCR-ALS



A: aumento en la dimensión temporal

B: aumento en la dimensión espectral

En ninguno de los casos se representó la matriz E de los errores

Cualquiera sea el modo de aumentar las matrices, las predicciones de concentración en las muestras se realizan construyendo una curva de calibración pseudounivariada con las concentraciones relativas de los calibradores contenidas en la matriz optimizada C_t o S_e .

Dado un analito n , para una calibración realizada con una matriz D_e , se seleccionan los elementos de S_e correspondientes a los I calibradores, los cuales van de $S_e(1,n)$ a $S_e(IK,n)$. Cada serie de K valores corresponde al perfil en la dimensión temporal para una muestra en particular. El área bajo el perfil es proporcional a la concentración del analito, por lo que puede utilizarse esta información para construir una **curva de calibrado pseudounivariada** de la siguiente forma:

$$\left[\sum_{k=1}^K S_e(k,n) \middle| \sum_{k=1}^K S_e[(k+K),n] \middle| \dots \middle| \sum_{k=1}^K S_e\{[k+K(I-1)],n\} \right] = k y \quad (1.31)$$

donde y es el vector de las concentraciones de calibración y cada sumatoria agrupa los k elementos de S_e correspondientes al analito y los calibradores. Una vez que se obtiene k de la Ecuación 1.31, la interpolación de los valores extraídos de las muestras incógnitas provee y_u , es decir la concentración del analito en la misma:

$$y_u = \frac{1}{k} \sum_{k=1}^K S_e[(k+IK),n] \quad (1.32)$$

Cuando el aumento se realiza en el modo temporal también se emplean las ecuaciones 1.31 y 1.32, con los elementos de $S_e(k,n)$ reemplazados por las series análogas de J elementos de $C_t(j,n)$ tomadas a partir de la matriz C_t .

1.9.2.5.1. Cifras de mérito

En MCR-ALS las cifras de mérito se calculan de la misma manera que en la calibración univariada utilizando los parámetros de la regresión pseudounivariada.

1.9.2.6. U-PLS/RBL

El algoritmo PLS permite calibrar, predecir y estudiar estadísticamente los residuos en forma separada para cada componente de una muestra y es ideal para el análisis de muestras en las que los componentes tienen intensidades espectrales muy diferentes. Es un método de calibración inversa que calcula factores espectrales o **variables latentes** dependientes de la concentración del o los analitos utilizando sólo información de los estándares (Haaland y Thomas 1988).

En U-PLS se aprovechan las ventajas de PLS trabajando en una estrategia que implica dos pasos. En primer lugar las I matrices $X_{c,i}$ ($K \times J$) con los datos de calibración, se vectorizan y se agrupan en una matriz respuesta R ($JK \times I$). La matriz R se utiliza para generar el modelo de calibración junto con el vector de las concentraciones de calibración y ($N_c \times 1$), siendo N_c el número de compuestos

calibrados. Para esto, \mathbf{R} se descompone en dos matrices \mathbf{W} y \mathbf{P} , que contienen dos clases de factores (variables latentes): unos llamados *weight loading factors*, contenidos en la matriz \mathbf{W} , y otros llamados simplemente *loadings*, contenidos en la matriz \mathbf{P} . Ambas matrices resultan de $(JK \times A)$, donde A es el número de factores o variables latentes, y se obtienen además, los coeficientes de regresión en un vector \mathbf{v} ($A \times 1$). La obtención de estos factores se lleva a cabo mediante un algoritmo iterativo cíclico basado en una estrategia de validación interna cruzada dejando fuera un estándar por vez (Haaland y Thomas 1988).

En segundo lugar se introduce la información de la muestra en la que se necesita predecir la concentración del analito. Si en la muestra no aparecen sustancias interferentes, pueden utilizarse los coeficientes de regresión de \mathbf{v} sin inconvenientes para predecir las concentraciones de los analitos

$$y_u = \mathbf{t}_u^T \mathbf{v} \quad (1.33)$$

donde \mathbf{t}_u es el score de la muestra obtenido por proyección de los datos vectorizados de la matriz de los datos de la muestra \mathbf{X}_u en el espacio de los factores latentes A :

$$\mathbf{t}_u = (\mathbf{W}^T \mathbf{P})^{-1} \mathbf{W}^T \text{vec}(\mathbf{X}_u) \quad (1.34)$$

Cuando en la muestra aparecen compuestos no esperados, la matriz \mathbf{X}_u genera scores inadecuados para la predicción por tener residuos (s_p) excesivamente altos en comparación al ruido instrumental, el que se determina fácilmente por el análisis de réplicas.

En la Ecuación 1.35 se muestra la forma de calcular los residuos de la predicción para la concentración del analito:

$$s_p = \frac{\|\mathbf{e}_p\|}{JK - A} = \frac{\|\text{vec}(\mathbf{X}_u) - \mathbf{P}(\mathbf{W}^T \mathbf{P})^{-1} \mathbf{W}^T \text{vec}(\mathbf{X}_u)\|}{JK - A} = \frac{\|\text{vec}(\mathbf{X}_u) - \mathbf{P} \mathbf{t}_u\|}{JK - A} \quad (1.35)$$

donde $\|\cdot\|$ indica la norma Euclídea.

Si la muestra contiene entonces componentes inesperados que producen s_p excesivamente altos, puede aplicarse el procedimiento de bilinearización residual (RBL) para resolverlos (Öhman y col 1990b). RBL está basado en SVD, que logra modelar el efecto de las interferencias, alcanzando de esta manera la ventaja de segundo orden.

Dada una muestra que contiene componentes no calibrados, su señal puede ser descompuesta en dos partes: una que puede ser modelada usando las variables latentes de la calibración, \mathbf{X}_{mod} y otra que no puede ser modelada con estas variables, $\mathbf{X}_{\text{no_mod}}$:

$$\mathbf{X}_u = \mathbf{X}_{\text{mod}} + \mathbf{X}_{\text{no_mod}} \quad (1.36)$$

\mathbf{X}_{mod} se puede expresar en función de las variables latentes de la calibración \mathbf{P} y de los *loadings* de la muestra asociada con \mathbf{t}_u , de la siguiente manera:

$$\text{vec}(\mathbf{X}_u) = \mathbf{P} \mathbf{t}_u + \mathbf{e}_{\text{mod}} + \text{vec}(\mathbf{X}_{\text{no_mod}}) \quad (1.37)$$

donde \mathbf{e}_{mod} es el vector de los residuos no ajustados en \mathbf{X}_{mod} mediante el modelo PLS de A factores y tiene elementos del orden del ruido instrumental.

Si en $\mathbf{X}_{\text{no_mod}}$ existen datos que tengan una estructura bilineal con valores mayores que el ruido experimental, estos pueden ser modelados por SVD, que permite la estimación de los perfiles de las interferencias \mathbf{b}_{int} y \mathbf{c}_{int} mediante la minimización de la norma del vector de los residuos \mathbf{e}_u (calculado mientras se ajustaron los datos de la muestra a la suma de las contribuciones relevantes):

$$\text{vec}(\mathbf{X}_u) = \mathbf{P} \mathbf{t}_u + \text{vec}[\mathbf{g}_{\text{int}} \mathbf{b}_{\text{int}} (\mathbf{c}_{\text{int}})^T] + \mathbf{e}_u \quad (1.38)$$

donde \mathbf{b}_{int} y \mathbf{c}_{int} son los autovectores de \mathbf{E}_p y \mathbf{g}_{int} es un factor de escalado. \mathbf{E}_p es la matriz de $J \times K$ obtenida al reorganizar los $JK \times 1$ \mathbf{e}_p vectores.

Durante este procedimiento \mathbf{P} se mantiene constante con los valores de calibración y \mathbf{t}_u varía hasta minimizar $\|\mathbf{e}_u\|$.

La minimización se realiza mediante el procedimiento de Gauss-Newton comenzando por \mathbf{t}_u de la Ecuación 1.34. Una vez que se minimiza $\|\mathbf{e}_u\|$ en la Ecuación 1.38, las concentraciones de los analitos se calculan usando la Ecuación 1.33, mediante la introducción del vector final encontrado por el procedimiento de GN.

El número de interferencias N_{int} se puede estimar comparando los residuos finales \mathbf{s}_u con el nivel de ruido experimental:

$$\mathbf{s}_u = \frac{\|\mathbf{e}_u\|}{[JK - N_{\text{cal}} + N_{\text{int}}]^{1/2}} \quad (1.39)$$

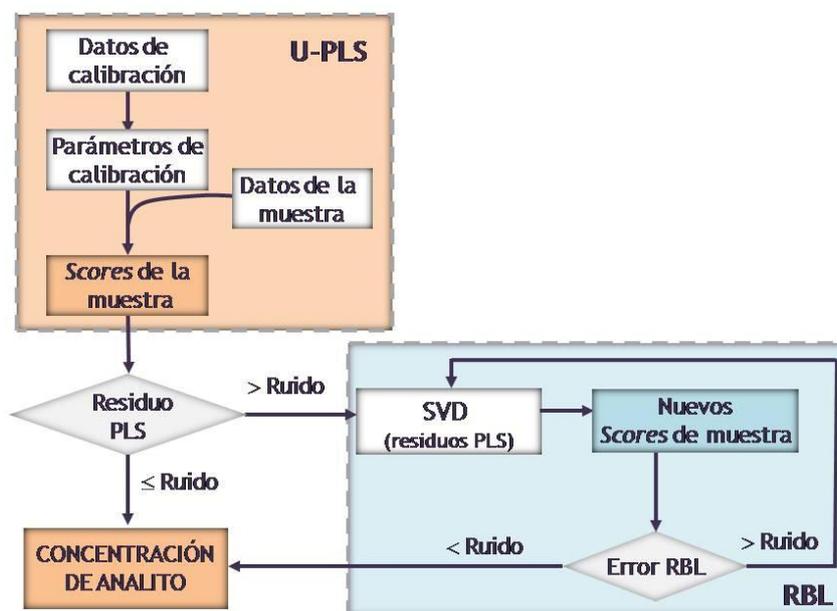
donde \mathbf{e}_u viene de la Ecuación 1.38 y N_{cal} es el número de analitos calibrados.

En general, un gráfico de \mathbf{s}_u para un dado número de componentes mostrará valores decrecientes, comenzando en \mathbf{s}_p cuando el número de componentes es igual a A , hasta que se estabiliza en un valor compatible con el ruido experimental, permitiendo localizar el número correcto de componentes (Olivieri 2005, Lozano y col 2008).

No debe perderse de vista que para $N_i > 1$ los perfiles provistos por el análisis de SVD de \mathbf{E}_p ya no representan el perfil real de la interferencia, debido a que los componentes principales tienen la restricción de ortogonalidad.

En la Figura 1.9 se resumen gráficamente los pasos involucrados al aplicar el algoritmo U-PLS/RBL a una muestra que contiene componentes no esperados.

Figura 1.9: Pasos del algoritmo UPL-RBL



1.9.2.6.1. Cifras de mérito

Las cifras de mérito que pueden calcularse para U-PLS/RBL son las siguientes (Olivieri 2005):

- La sensibilidad de calibración (SEN_n) que está dada por:

$$SEN_n = \frac{1}{\| \mathbf{P}_{\text{eff}}^+ \mathbf{v} \|} \quad (1.40)$$

donde \mathbf{P}_{eff} es una matriz dada por:

$$\mathbf{P}_{\text{eff}} = (\mathbf{P}_{\text{c,int}} \otimes \mathbf{P}_{\text{b,int}})^T \mathbf{P} \quad (1.41)$$

donde \mathbf{P} es la matriz de los *loadings* ($JA \times A$) provista por el modelo PLS desdoblado,

y $\mathbf{P}_{\text{c,int}}$ y $\mathbf{P}_{\text{b,int}}$ son las matrices de proyección provistas por las siguientes ecuaciones:

$$\mathbf{P}_{\text{c,int}} = \mathbf{I} - \mathbf{C}_{\text{int}} \mathbf{C}_{\text{int}}^+ \quad (1.42)$$

$$\mathbf{P}_{\text{b,int}} = \mathbf{I} - \mathbf{B}_{\text{int}} \mathbf{B}_{\text{int}}^+ \quad (1.43)$$

donde \mathbf{B}_{int} y \mathbf{C}_{int} contienen los perfiles de las interferencias como columnas.

Si se emplea la ventaja de segundo orden debe tenerse en cuenta que la Ecuación 1.40 implica el cálculo de sensibilidad para la muestra, por lo que SEN_n no puede ser definida para el método multivariado como un todo. Por lo tanto, la sensibilidad del método se puede estimar como un valor promedio para un juego de muestras.

- La **sensibilidad analítica** (γ), y su inversa ($1/\gamma$) que al igual que en la calibración univariada tiene unidades de concentración:

$$\gamma = SEN_n/s_y \quad (1.44)$$

donde s_y es el ruido instrumental.

- LOD y LOQ se definen en analogía con la calibración univariada como:

$$LOD = 3.3 s_y/SEN_n \quad (1.45)$$

$$LOQ = 10 s_y/SEN_n \quad (1.46)$$

1.9.3. Transferencia de calibración

Sin dudas, el modo más conveniente y sencillo de calibración para la cuantificación de analitos es el basado en un modelo construido con estándares preparados en solventes puros. Sin embargo, se observan situaciones en las que la respuesta del analito en las muestras es diferente a aquella obtenida al preparar soluciones de los mismos en solventes puros. Además de la señal de fondo y la contribución de las interferencias, las principales causas de variaciones de la señal analítica son debidas al efecto matriz o al efecto del pretratamiento de muestras, como, por ejemplo, procedimientos de extracción o limpieza (Goicoechea 2011).

En apartados anteriores se vieron las estrategias analíticas y quimiométricas para solventar los problemas de la señal de fondo, las contribuciones de interferencias y el efecto matriz. Se analizarán ahora las formas de solucionar el cambio de señal debido a los pretratamientos de muestras mediante el uso de algoritmos de **estandarización de la señal** que pueden aplicarse tanto a la calibración univariada como multivariada (Feudale y col 2002, Santiago Valverde y col 2006).

El más utilizado de estos algoritmos es el de la estandarización directa sucesiva, conocido como **PDS** (del inglés, *Piecewise Direct Standardization*) (Yang y col 1991). Esta estrategia relaciona las respuestas de muestras obtenidas en una situación A (X_A) con las respuestas obtenidas en una situación B (X_B), describiéndose esta relación mediante una matriz de transformación F , de acuerdo con:

$$X_A = X_B F \quad (1.47)$$

La matriz F está compuesta por vectores de regresión \mathbf{b}_k , del tipo PLS, cada uno de los cuales se obtuvo mediante un modelo multivariado de regresión entre la respuesta r de una muestra medida a la longitud de onda j en la situación A y la correspondiente ventana de la respuesta obtenida en la situación B :

$$\mathbf{r}_j = \mathbf{R}_j \mathbf{b}_j \quad (1.48)$$

donde \mathbf{R}_j es la matriz respuesta de las muestras transferidas y \mathbf{b}_j es el vector de coeficientes de transformación para la longitud de onda j .

En PDS se llama ventana a la cantidad de variables secundarias tenidas en cuenta en cada uno de esos cálculos locales, y tolerancia (T) al valor umbral que permite determinar el número óptimo de factores para cada modelo local. Los vectores individuales son luego ensamblados para formar una matriz diagonal F , de acuerdo con:

$$\mathbf{F} = \text{diag} (\mathbf{b}_1^T, \mathbf{b}_2^T, \dots, \mathbf{b}_j^T, \dots, \mathbf{b}_k^T) \quad (1.49)$$

donde k es el número de longitudes de onda. Finalmente, la respuesta de cada muestra desconocida se puede estandarizar de acuerdo con:

$$\mathbf{x}_s^T = \mathbf{x}_0^T \mathbf{F} \quad (1.50)$$

donde \mathbf{x}_0 y \mathbf{x}_s corresponden a los datos de la muestra antes y después de la estandarización.

Como se puede observar PDS fue desarrollado para transferir señales de primer orden, es decir vectores, sin embargo, los datos de segundo orden pueden transferirse desdoblándolos en vectores y tratándolos como una concatenación de señales de primer orden (Goicoechea 2011).

1.10. Validación

Siempre que se desarrolla un nuevo método analítico debe demostrarse que el mismo proporciona resultados confiables y adecuados para la finalidad o propósito perseguido ya que, en general, diferentes decisiones de distinta relevancia, se tomarán en base a estos resultados.

En este contexto, la validación puede definirse como un proceso basado en estudios sistemáticos de laboratorio mediante el cual se pone de manifiesto que un método analítico determinado funciona de manera adecuada en relación a la aplicación que se le quiere dar (Massart 1997).

Este proceso implica la realización de experimentos diseñados y concretados bajo estricto control, para aplicar luego un tratamiento estadístico a los resultados obtenidos, evaluándolos en base a criterios preestablecidos.

La estrategia de validación, el tipo y la cantidad de experimentos a realizar, dependerán del método en cuestión y del tipo de calibración que se haya realizado. Sin embargo, en todos los casos la validación debe contemplar:

- El proceso analítico completo, incluyendo todas las etapas del pretratamiento de la muestra antes de la medición de la señal analítica.
- El rango completo de concentraciones en las que se utilizará el método.
- La matriz particular para la cual fue desarrollado el procedimiento

Diversos organismos internacionales, tales como la Asociación Oficial de Químicos Analíticos **AOAC** (*Association of Oficial Analytical Chemists*), la Asociación Europea de Química Analítica **EURACHEM** (*European Analytical Chemistry*) y la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada **IUPAC** (*International Union Of Pure and Applied Chemistry*) tienen por objeto la elaboración y difusión de métodos analíticos de referencia para distintos campos de actividad y ofrecen criterios para la validación de métodos. Además, para los métodos destinados al análisis de fármacos, la Farmacopea de los Estados Unidos **USP** (*United State Pharmacopoeia*), el Comité Internacional de Armonización de las farmacopeas **ICH** (*International Conference on Harmonisation*), y la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos **FDA** (*Food and Drug Administration*) proveen de lineamientos para llevar a cabo las validaciones.

Los procedimientos de validación realizados en la presente tesis fueron basados en las guías e indicaciones suministradas por estos organismos (EURACHEM 1998, EURACHEM 2002, IUPAC 1999, IUPAC 2002, FDA 2000, FDA 2001, ICH 2005, USP32 2008).

Capítulo 2



Nitrato de miconazol en cremas dérmicas

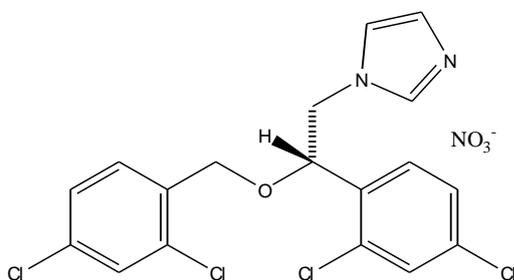
Pureza de pico y validación

2.1. Miconazol

2.1.1. Características físico-químicas

El miconazol (MIC) es un derivado del imidazol: 1H-Imidazol,1-[2-(2,4-diclorofenil)-2-[(2,4- diclofenil)metoxi]etil]- (±) muy utilizado en medicina por sus propiedades antimicóticas (Al-Badr 2005). Dependiendo de la forma farmacéutica puede utilizarse tanto como droga base o como nitrato de miconazol (N-MIC) cuya estructura química se muestra en la Figura 2.1.

Figura 2.1: Estructura química del nitrato de miconazol



El N-MIC tiene el aspecto de un polvo blanco muy poco soluble en agua, y medianamente soluble en metanol y etanol (BP 2009).

2.1.2. Propiedades antibióticas y usos

El MIC tiene un amplio espectro de actividad, siendo un potente antibiótico para los dermatofitos, la *Candida albicans* y varios gérmenes Gram positivos (Piel y col 1998).

Su mecanismo de acción antibiótica se da a través de la inhibición de la 14-alfa-lanosterol demetilasa, una enzima clave en la biosíntesis de ergosterol. Al no producirse ergosterol se acumulan en la membrana celular esteroides 14-alfa-metilados, que resultan tóxicos para las levaduras susceptibles. También se ha demostrado que, al igual que otros azoles en general, produce la generación de niveles intracelulares excesivamente altos y tóxicos de peróxido de hidrógeno mediante la activación de la NADH-oxidasa y la inhibición de la citocromo peroxidasa (Francois 2007).

Debido a sus propiedades antimicóticas MIC se utiliza ampliamente para el tratamiento de las micosis dérmicas, orales y vaginales. Puede ser administrado también en forma intravenosa para el tratamiento de infecciones generalizadas. Actualmente, se emplea en una gran variedad de formulaciones farmacéuticas. Como sustancia base MIC se utiliza en forma de inyectables o para el tratamiento de candidiasis oro-bucal en geles y últimamente en presentaciones novedosas, como parches y tabletas bio-adhesivas (Nafee y col 2003, Lalla y col 2011). Mientras tanto, N-MIC se utiliza en cremas, ungüentos y polvos de uso tópico, como así también en supositorios vaginales asociado con metronidazol (Ozyurt y col 2001).

La manera más usual de aplicación del N-MIC para el tratamiento de las dermatitis es en forma tópica, sobre la lesión, dos veces al día, por medio de cremas, ungüentos o geles en una concentración de 2.0% p/p. En particular, la dermatitis de Diaper, un desorden dermatológico bastante común en la infancia, y que frecuentemente se asocia a infecciones por *Candida albicans*, se trata generalmente con cremas de N-MIC al 0.25% p/p (Eichenfield 2007).

Las preparaciones comerciales de uso dérmico suelen contener N-MIC tanto como principio activo único, o asociado con esteroides anti-inflamatorios u otros agentes antimicrobianos como la gentamicina.

2.2. Cremas dérmicas

Las cremas de uso medicinal son formas de dosificación semisólidas que contienen uno o más componentes activos disueltos o dispersos en una base adecuada. Tradicionalmente este término se aplicaba a las preparaciones semisólidas con una consistencia relativamente fluida, formuladas como una emulsión de agua en aceite o de aceite en agua. Sin embargo, recientemente se ha restringido el término sólo a los productos consistentes en emulsiones de aceite en agua o a las dispersiones acuosas micro-cristalinas de ácidos grasos de cadena larga o de alcoholes. Estas nuevas formulaciones resultan lavables y más aceptables, cosmética y estéticamente (USP 32).

Este tipo de preparaciones resultan muy convenientes en farmacia, cuando se necesita tratar lesiones localizadas en la piel, que no justifican un uso sistémico del medicamento.

Los excipientes utilizados en la elaboración de las cremas son muy diversos pudiendo actuar como simple soporte de los principios activos o ejerciendo una

acción protectora sobre ellos o influyendo en el grado de penetración del preparado en la piel, y por lo tanto en su eficacia.

Generalmente, estas formulaciones consisten en una mezcla de múltiples componentes que le confieren propiedades galénicas (reología, tamaño de partícula, etc.) únicas, asociadas a la capacidad de liberación del fármaco. Hoy en día, muchas de las inversiones en innovación de la industria farmacéutica se centran en la diferenciación de la formulación de un producto como clave para justificar un aumento en el precio o posicionamiento del mismo en el mercado (Boix-Montanes 2009).

2.3. El problema analítico

Tanto las industrias farmacéuticas como los organismos estatales de control deben asegurar que los medicamentos, ya sean de uso hospitalario o de venta en el mercado, cumplan con determinadas **especificaciones** o estándares de calidad, garantizando así su eficacia y seguridad. Para esto, tanto las materias primas como los productos terminados, deben someterse a estrictos controles que requieren de la aplicación de métodos analíticos apropiados. Las cremas de N-MIC utilizadas para el tratamiento de las micosis dérmicas no escapan a estos requerimientos.

En nuestro país, el Instituto Nacional del Medicamento (INAME) es el organismo dependiente de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), que tiene como misión el registro, la fiscalización y el control de los medicamentos, tanto de origen nacional como importados. Este instituto establece en su Disposición 2819/2004 que, en lo posible, los laboratorios de control de calidad deben utilizar para el análisis de medicamentos los **métodos oficiales** de ensayo, publicados en las diversas **farmacopeas** que establecen a su vez, las especificaciones a cumplir por cada fármaco (ANMAT 2004). Sin embargo, muchas veces no se dispone de estos métodos oficiales para una determinada preparación o los mismos no se ajustan a la formulación comercial en particular que debe controlarse.

Esta última situación se da muy a menudo en las cremas, preparaciones que, como se mencionó anteriormente, pueden variar mucho en su composición de un laboratorio productor a otro. En estos casos, es necesario desarrollar nuevos métodos de análisis que satisfagan los requerimientos específicos para la muestra concreta que se está evaluando, demostrando esto último a través de un intensivo proceso de validación.

Al desarrollar un método analítico para el control de calidad de fármacos es conveniente tener en cuenta la posibilidad de que en el mismo procedimiento puedan realizarse más de una determinación en forma simultánea, como por ejemplo: identificación, valoración, determinación de impurezas o productos de degradación, etc. Esta estrategia facilita mucho la tarea de control y tiene grandes beneficios económicos. Es por esta razón que, hoy en día se trabaja mucho en la industria farmacéutica en el desarrollo de **métodos indicativos de estabilidad**. Es decir, métodos que pueden determinar con exactitud y precisión la cantidad del ingrediente farmacéutico activo, libre de potenciales interferencias como productos de degradación, precursores de síntesis, excipientes u otras impurezas potenciales, que a su vez son separadas y determinadas simultáneamente (FDA 1985).

En particular, el desarrollo de métodos de análisis para cremas no es una tarea sencilla debido a la composición esencialmente compleja de la matriz o crema base en la que está inmerso el analito de interés. Esta base generalmente contiene componentes lipofílicos como vaselinas, parafinas, alcoholes, ácidos grasos, ésteres y otros surfactantes emulsionados en una solución acuosa de composición variable. Actualmente la técnica de elección para llevar a cabo este cometido, es la cromatografía líquida, que logra separar la señal del analito de las de los excipientes. Sin embargo, la gran cantidad de componentes insolubles en agua que presentan muchas veces las formulaciones, hace necesario aplicar además, un procedimiento previo de pretratamiento de la muestra para extraer los compuestos hidrosolubles.

2.3.1. Métodos oficiales

Los métodos de las farmacopeas son métodos oficiales, es decir, métodos que han sido desarrollados y validados, descritos en detalle y publicados por una agencia o institución gubernamental con la intención de que sean los prescritos por la legislación para homologar los resultados obtenidos por los laboratorios (Valcárcel 1999).

Las farmacopeas de trascendencia internacional, tales como la de los Estados Unidos: United State Pharmacopoeia en su edición número 32 (USP 32) y la de Gran Bretaña: British Pharmacopeia del año 2009 (BP 2009) establecen diferentes especificaciones y métodos de análisis para las materias primas y cremas de N-MIC. Por otro lado, nuestra Farmacopea Nacional Argentina, en su séptima edición (FNA 7ª Ed.), sólo cuenta con la monografía de la materia prima de N-MIC, pero no se

encuentran codificadas aún en la misma las preparaciones de este fármaco. En la Tabla 2.1 puede apreciarse la diversidad de metodologías propuestas por las farmacopeas para el control de calidad de N-MIC en materias primas y cremas.

Tabla 2.1: Métodos oficiales de análisis y especificaciones para N-MIC

| Materia Prima | | | |
|---|--|---|------------------------------------|
| | BP 2009 | USP 32 | FNA 7ª Ed |
| Identificación | a) Punto de fusión b) Absorción IR c) CCD ^a - Método 1 d) Reacción de NO ₃ ⁻ | a) Absorción IR b) Absorción UV | a) Absorción IR b) Absorción UV |
| Valoración | TP (SNA ^b) (99.0-101.0 % SVD ^d) | TP (SNA) (98.0-102.0 % SVD) | TP (SNA) (98.0-102.0 % SVD) |
| Sustancias Relacionadas | CLAR - Método 1 | CLAR - Método 1 | CCD - Método 2 |
| Cremas de N-MIC | | | |
| | BP 2009 | USP 32 | |
| Identificación | a) ELL ^c /Absorción UV b) Extracción 1 / CLAR - Método 1 | Extracción 2 / CLAR - Método 2 | |
| Valoración | Extracción 1 / CLAR - Método 1 (95.0-105.0% SVD) | Extracción 2 / CLAR - Método 2 (90-0 - 110.0% SVD) | |
| Sustancias Relacionadas | Extracción 1 / CLAR - Método 1 | ----- | |
| Cremas de N-MIC e Hidrocortisona | | | |
| | BP 2009 | | |
| Identificación | a) CCD - Método 3 b) Extracción 3/ CLAR - Método 3 | | |
| Valoración | Extracción 3/ CLAR - Método 3 (95.0-105.0% SVD) | | |
| Sustancias Relacionadas | Extracción 3/ CLAR - Método 3 | | |
| Polvo de uso tópico / Supositorios vaginales de N-MIC | | | |
| | USP 32 | | |
| Identificación | Extracción/ Absorción IR | | |
| Valoración | Extracción/ Cromatografía Gaseosa (90-0 - 110.0% SVD) | | |

Donde:

^a CCD significa Cromatografía en Capa Delgada.

^b TP (SNA) significa Titulación Potenciométrica en Solvente No Acuoso.

^c ELL significa Extracción Líquido-Líquido.

^d SVD significa Sobre el Valor Declarado por el fabricante

Como puede verse, un analista de control de calidad se encuentra con una gran oferta de métodos oficiales para el análisis de N-MIC. Sin embargo, ninguno de ellos logra resolver completamente la identificación, valoración y sustancias relacionadas simultáneamente y en más de una forma farmacéutica.

En cuanto a los métodos propuestos por CLAR, ninguno de ellos utiliza la ventaja del DAD para asegurar la identificación del principio activo, por lo que la misma debe confirmarse por otra técnica complementaria.

El Método 1 de CLAR propuesto por USP y FB para la determinación de sustancias relacionadas en materias primas consiste en un sistema isocrático que emplea una fase móvil de acetato de amonio 0.2 mol L^{-1} , metanol (MeOH) y acetonitrilo (ACN) (38:32:30) a un flujo de 2.0 mL min^{-1} y una columna C18 de $4.6 \times 100 \text{ mm}$ con partículas de $3 \mu\text{m}$. En estas condiciones el análisis cromatográfico requiere de un tiempo prolongado para la estabilización del sistema y de un tiempo total de corrida de aproximadamente 30 minutos para obtener los resultados.

Por otro lado la BP utiliza este mismo sistema cromatográfico para la determinación de sustancias relacionadas y para la valoración de N-MIC en cremas. Sin embargo, para la crema que contiene también hidrocortisona utiliza otro sistema consistente en una fase móvil de dihidrógeno fosfato de amonio 0.01 mol L^{-1} a $\text{pH}=6.0$, tetrahidrofurano y ACN con un gradiente de composición y el mismo tipo de columna que en el caso anterior.

Los procedimientos de extracción previos a la cromatografía son diferentes para una y otra preparación, consistiendo en simples diluciones en metanol:tetrahidrofurano o MeOH puro respectivamente, siempre a temperatura ambiente.

Por otro lado, la USP propone para la valoración de las cremas una cromatografía líquida empleando como fase móvil una solución reguladora de trietilamina y ácido fosfórico a $\text{pH}=2.5$ en una mezcla con ACN, tetrahidrofurano y MeOH (8:5:4:3) en una columna de $4.6 \times 250 \text{ mm}$ conteniendo una fase estacionaria con grupos fenilo unidos químicamente a sílice porosa. El procedimiento de extracción previa en este caso consiste en una disolución de la crema en fase móvil a $40\text{-}45 \text{ }^\circ\text{C}$ y posterior filtración por filtro de membrana de $0.45 \mu\text{m}$ de poro.

Finalmente, en ninguna de las farmacopeas consultadas se encuentra publicada la monografía de las cremas de N-MIC en asociación con valerato de betametasona y sulfato de gentamicina. Esta última preparación es muy utilizada en nuestro país, existiendo varias marcas comerciales de la misma.

2.3.2. Métodos de la literatura

En los últimos años no se han publicado en revistas científicas internacionales nuevos métodos analíticos para la valoración de MIC o N-MIC en materias primas, y sólo se encuentran unos pocos métodos para el análisis de preparaciones. Se han desarrollado métodos colorimétricos (Khashba y col 2000), espectrofotométricos (Wrobel y col 1999, Erk y col 2001), cromatográficos (Akay y col 2002) y de resonancia magnética (Salem y col 2006) aplicados al análisis de comprimidos, polvos y óvulos de MIC o N-MIC como principio activo único o en combinación con otros fármacos. Para el análisis de cremas se han presentado métodos mucho más complejos como, por ejemplo, una extracción de fase sólida (EFS) previa a una cromatografía con reacción fotoquímica post-columna (Di Pietra y col 1992), o una extracción con fluidos supercríticos seguida de espectroscopia derivada (Bonazzi y col 1998). También se ha publicado recientemente un método por CLAR con gradiente de elución para la determinación de nitrato de econazol en cremas utilizando N-MIC como estándar interno sin procedimiento de extracción previo (Gaona-Galdos y col 2008).

2.3.3. Selección de la metodología

La cromatografía líquida de alta resolución con sistema multicanal para solventes y acoplada a un detector de arreglo de diodos (CLAR-DAD) es una técnica analítica de mucha utilidad para el desarrollo de métodos de análisis de fármacos, especialmente de preparaciones de composición compleja. En general, la modalidad en fase reversa de la CLAR, que utiliza una fase estacionaria de características no polares y una fase móvil polar, es la forma más versátil y utilizada en este tipo de situaciones ya que logra separar una gran diversidad de compuestos polares y no polares variando adecuadamente la composición de la fase móvil.

La utilización de sistemas de gradiente, generados mediante una variación temporal de la proporción de los componentes de la fase móvil a temperatura controlada, permite lograr una gran selectividad, separando compuestos de polaridades muy diferentes en un tiempo razonable de análisis. La aplicación de gradientes es, habitualmente, estrictamente necesaria para el desarrollo de métodos indicativos de estabilidad, los cuales deben ser capaces de detectar simultáneamente muchos compuestos que tienen diversas afinidades por la fase estacionaria.

Por otro lado, el detector de arreglo de diodos permite monitorear el espectro de absorción de todos los picos que eluyen del sistema, siendo una herramienta clave para la identificación de los compuestos y la evaluación de homogeneidad y el análisis de la pureza de los picos (Poole 2003).

2.4. Objetivos

Los objetivos del presente capítulo de tesis fueron:

- Desarrollar un método por **CLAR-DAD indicativo de estabilidad** para la determinación simultánea de la identificación, valoración y estabilidad de N-MIC en materias primas y cremas dérmicas.
- Establecer un procedimiento de **pretratamiento de muestra** simple, rápido y económico para separar el principio activo de ingredientes lipofílicos de la crema.
- Estudiar las potencialidades de los algoritmos de evaluación de **pureza de pico** para asegurar la especificidad del método.
- Aplicar **calibración univariada** y obtener cifras de mérito.
- **Validar** exhaustivamente el método desarrollado siguiendo las recomendaciones de organismos internacionales.

2.5. Materiales y métodos

2.5.1. Instrumental y *softwares*

Todas las experiencias se llevaron a cabo utilizando un cromatógrafo líquido Agilent Serie 1100 (Waldbron, Alemania). El mismo consta de una bomba cuaternaria, degasificador de membrana, horno de columna termostaticado, inyector automático y detector UV-Vis con arreglo de diodos.

La columna empleada como fase estacionaria fue una ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 5 µm de tamaño de partícula) elaborada con sílice de alta pureza y doble bloqueo de silanoles residuales, de Agilent Technologies.

Para la adquisición y procesamiento de datos cromatográficos se utilizó el software Chemstation versión B 0103 de Agilent.

2.5.2. Reactivos

El estándar de trabajo de N-MIC (CAS 22832-87-7) fue preparado en nuestro laboratorio a partir de una sustancia comercial, analizándola exhaustivamente según los métodos y especificaciones de la USP 30 para el control de materia prima.

El MeOH y el ACN calidad cromatográfica fueron adquiridos en Aberkon Química (José León Suarez, Buenos Aires, Argentina). El ácido acético glacial grado analítico fue de Laboratorios Cicarelli (San Lorenzo, Argentina). El agua empleada fue agua ultra pura obtenida en un equipo Milli-Q Biocel System de Millipore SAS (Molsheim, Francia) en nuestro laboratorio.

Las materias primas de todos los principios activos y excipientes constituyentes de las cremas fueron provistas por Laboratorios LAFORMED S.A.

2.5.3. Muestras

Las muestras con las que se realizó este trabajo nos fueron suministradas por un laboratorio estatal productor de fármacos de la provincia de Formosa, Argentina, LAFORMED S.A. Los distintos tipos de muestras fueron:

- Materias Primas de N-MIC.
- Cremas de N-MIC al 2.0 % p/p.
 - Recientemente elaboradas
 - Envejecidas naturalmente por 18 meses
- Cremas de N-MIC al 2.0% p/p, betametasona (como valerato) al 0.10% p/p y gentamicina (como sulfato) al 0.10% p/p.
 - Recientemente elaboradas
 - Envejecidas naturalmente por 18 meses
- Crema base, conteniendo todos los excipientes de la formulación pero ningún principio activo.

Las cremas envejecidas naturalmente fueron muestras de cremas envasadas en pomos y almacenadas en este envase en condiciones de temperatura y humedad ambiente. El almacenamiento de 18 meses totales contempló un período que superaba el período de aptitud de las preparaciones que había sido establecido en 12 meses por la empresa productora.

La composición de la crema base se describe en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2: Composición de la crema base

| Función | Excipiente | Propiedades |
|-------------------------------|------------------------------|---|
| Soporte para dar consistencia | Parafina líquida | Líquido aceitoso, incoloro, insoluble en agua, actúa como lubricante. |
| | Parafina sólida | Sólido traslucido blanquecino de aspecto graso y untuoso, insoluble en agua. |
| Solventes | Alcohol bencílico | Líquido incoloro parcialmente soluble en agua. |
| | Agua | Líquido incoloro, solubiliza compuestos polares o polarizables. |
| Emulsificantes | Cetomagrogol 1000 | Surfactante no-iónico de la familia del polietilenglicol. Sólido blanco hidrosoluble. |
| | Alcohol cetoestearílico | Sólido blanco, insoluble en agua, actúa como estabilizante de la emulsión. |
| Humectante | Propilenglicol | Líquido aceitoso claro, higroscópico, miscible con agua. |
| Conservantes | Metilparabeno | Sólido blanco poco soluble en agua con actividad bactericida y fungicida para mohos. |
| | Propilparabeno | Sólido blanco poco soluble en agua con actividad fungicida para levaduras. |
| Reguladores del pH | Dihidrógeno fosfato de sodio | Sólido blanco cristalino, soluble en agua. |
| | Ácido fosfórico | Líquido transparente ligeramente amarillento, soluble en agua. |
| | Trietanolamina | Líquido viscoso amarillo pálido soluble en agua. |

2.5.4. Pretratamiento de la muestra

Cada muestra de crema se homogeneizó perfectamente mezclándola con varilla de vidrio durante varios minutos antes de proceder a la extracción. Luego, se pesó exactamente una porción de aproximadamente 2.2 g en vaso de precipitados de vidrio de 250 mL y se agregó una alícuota de 15 mL de **solvente de extracción**. El vaso se cubrió con un vidrio de reloj y se colocó en baño de agua a 90°C hasta que todos los componentes de la crema se disolvieron o fundieron. El vaso se retiró del baño y se agitó la solución vigorosamente en agitador magnético durante cinco minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta que los componentes insolubles volvieron a solidificar. El ciclo de calentamiento-agitación-enfriamiento se repitió dos veces más para garantizar la solubilización y extracción completa del N-MIC. La suspensión obtenida finalmente se trasvasó a matraz de 25.0 mL lavando

perfectamente el vaso con un par de alícuotas de solvente de extracción y recogiendo las mismas en el matraz, se llevó a volumen utilizando el mismo solvente, se homogeneizó por inversión y se dejó unos minutos en reposo. A continuación, se llevó una porción de 10.0 mL a un tubo de centrifuga con tapa y se colocó en freezer a -20°C durante 20 min para lograr la precipitación de los compuestos lipofílicos insolubles, se centrifugó en frío por 15 min a 3500 rpm y se separó el sobrenadante límpido. Posteriormente, 3.00 mL del sobrenadante a temperatura ambiente se transfirió a un matraz de 10.0 mL y se llevó a volumen con una mezcla de agua y ACN (30:40), de manera de tener una composición final de solvente igual al del **solvente de inyección**. La solución resultante se llevó a un nuevo tubo de centrifuga con tapa y se colocó en freezer a -20°C durante 20 minutos. Los compuestos lipofílicos remanentes precipitaron completamente en esta última etapa y fueron separados nuevamente por centrifugación. Finalmente, una cantidad adecuada de la solución resultante, con una concentración aproximada de 0.53 mg mL^{-1} de N-MIC, se filtró a través de filtros de jeringa de membrana de nylon antes de ser colocada en un vial del inyector.

En la Figura 2.2 se muestra esquemáticamente el procedimiento de extracción descrito.

Figura 2.2: Esquema del procedimiento de extracción



2.5.5. Soluciones

Todas las soluciones fueron filtradas por filtro de membrana de nylon tipo jeringa en el momento previo a la inyección en el sistema cromatográfico.

2.5.5.1. Solvente de extracción y diluyente

Como **solvente de extracción** se utilizó MeOH ácido, el cual se preparó diluyendo ácido acético glacial a una concentración de 0.1% v/v en MeOH calidad cromatográfica.

Como **solvente de inyección** se utilizó una mezcla de agua, MeOH y ACN (30:30:40).

2.5.5.2. Soluciones estándar

Se prepararon las siguientes soluciones estándar:

- **Solución estándar concentrada** de N-MIC de 11.0 mg mL^{-1} disolviendo en MeOH calidad cromatográfica, una cantidad exactamente pesada del estándar de trabajo. Esta solución se conservó durante dos meses en heladera, a 4°C y protegida de la luz. Cada vez que fue necesario utilizarla se llevó previamente a temperatura ambiente y se fraccionó una alícuota.
- **Solución estándar de trabajo** de 0.526 mg mL^{-1} de N-MIC diluyendo un volumen apropiado de la solución estándar concentrada en matraz volumétrico con solvente de inyección. Se preparó diariamente.
- **Soluciones de calibración en solvente** en cinco niveles de concentración 0.263, 0.395, 0.526, 0.658 y 0.789 mg mL^{-1} de N-MIC diluyendo volúmenes apropiados de la solución estándar concentrada en matraces volumétricos con solvente de inyección. Este rango de calibración abarca un 50.0% a un 150.0% de la concentración de analito esperada en la solución muestra de ensayo. Cada nivel se preparó por triplicado.
- **Soluciones de calibración en matriz** en cinco niveles de concentración 0.263, 0.395, 0.526, 0.658 y 0.789 mg mL^{-1} de N-MIC. Estas soluciones se prepararon utilizando la crema base y siguiendo el procedimiento indicado en 2.5.4. Luego de pesar en sendos vasos varias porciones de crema base, se adicionaron a las mismas volúmenes apropiados y exactamente medidos de la solución estándar concentrada. Las mezclas se homogeneizaron perfectamente obteniéndose de esta manera soluciones calibradoras con las mismas concentraciones que los calibradores en

solvente puro, pero preparadas con la matriz de la muestra. Cada nivel de calibración fue preparado por triplicado.

- **Soluciones de matriz fortificadas** en tres niveles de concentración: 80.0, 100.0 and 120.0 % de la cantidad esperada del analito. Estas soluciones se prepararon utilizando la crema base y siguiendo el procedimiento indicado en 2.5.4. Luego de pesar en sendos vasos varias porciones de crema base, se adicionaron a las mismas, masas exactamente pesadas y apropiadas del estándar de trabajo. Las mezclas se homogeneizaron perfectamente obteniéndose de esta manera muestras artificiales con distintas concentraciones de N-MIC. Cada nivel de fortificación fue preparado por triplicado.

2.5.5.3. Soluciones muestra

Siguiendo el procedimiento de extracción descrito en 2.5.4. se obtuvieron los siguientes tipos de soluciones:

- **Soluciones muestra** para las distintas cremas analizadas.
- **Soluciones muestra blanco** procesando la matriz o muestra blanco.

Por otro lado se obtuvieron también:

- **Soluciones muestra de materia prima** preparadas de la misma manera que la solución estándar de trabajo pero utilizando materias primas de N-MIC

2.5.5.4. Soluciones de excipientes y otros principios activos

Para los estudios de selectividad se prepararon soluciones 0.50 mg mL^{-1} en MeOH de cada uno de los siguientes excipientes: alcohol cetosteárico, alcohol bencílico, propilenglicol, metilparabeno, propilparabeno y trietanolamina. El resto de los excipientes resultaron completamente insolubles tanto en MeOH como en fase móvil.

También se prepararon soluciones metanólicas 0.025 mg L^{-1} de los otros principios activos de la asociación: valerato de betametasona (VB) y sulfato de gentamicina (SG).

2.5.6. Sistema cromatográfico

La separación cromatográfica se realizó utilizando una fase móvil consistente en agua, MeOH y ACN en un gradiente de composición y velocidad de flujo (Tabla 2.3) con un tiempo total de análisis de 15 minutos.

Tabla 2.3: Gradiente de elución para la separación de MIC

| Tiempo (min) | % Agua | % MeOH | % ACN | Flujo (mL min ⁻¹) |
|--------------|--------|--------|-------|-------------------------------|
| 0.0 | 30.0 | 30.0 | 40.0 | 1.0 |
| 2.0 | 20.0 | 35.0 | 45.0 | 1.0 |
| 4.5 | 20.0 | 35.0 | 45.0 | 1.0 |
| 7.0 | 10.0 | 40.0 | 50.0 | 1.5 |
| 10.0 | 30.0 | 30.0 | 40.0 | 1.0 |

La columna fue termostatzada a 25 °C y se utilizó un volumen de inyección de 10.0 µL.

La detección del N-MIC se realizó en su máximo de absorción a 232 nm con un ancho de banda de 4 nm y tomando como longitud de onda de referencia la de 360 nm con un ancho de 100 nm. Simultáneamente se almacenaron los espectros de absorción de todos los picos en el rango de 200-500 nm para llevar a cabo los estudios de pureza de pico.

2.5.7. Validación

La validación del método se realizó siguiendo los lineamientos de la USP 32 y de las guías ICH Q1A-R2 (ICH 2003) y Q2-R1 (ICH 2005). Ninguno de estos documentos establece los criterios de aceptación para los parámetros a evaluar, por lo que los mismos fueron establecidos según los criterios convencionales utilizados en la industria farmacéutica (Ermer 2001, Lobrutto y Patel 2007).

Para la evaluación de los parámetros de regresión de la calibración univariada y la obtención de cifras de mérito se aplicaron los conceptos y procedimientos estadísticos descritos en la Introducción.

2.5.7.1. Selectividad

La selectividad del método se evaluó primeramente inyectando en forma secuencial y por triplicado cada una de las siguientes soluciones: solvente de inyección, solución estándar de trabajo, soluciones de cada uno de los excipientes solubles en MeOH, solución muestra blanco y soluciones muestra de ambos tipos de crema recientemente elaborada. En cada caso se verificó la cantidad de picos y se analizó la separación y resolución de los mismos.

Además, para establecer la capacidad del método de indicar estabilidad, se estudiaron tres lotes diferentes de cremas de N-MIC y tres lotes de cremas de N-MIC en asociación con VB y SG, todos envejecidos naturalmente. Cada lote se estudió por triplicado y se evaluó la separación de los picos secundarios que aparecían en cada caso.

Por último, se evaluó la pureza de pico del MIC por el método de correlación de espectros que se describe en la Introducción.

2.5.7.2. Adecuación del sistema y estabilidad de las soluciones

La evaluación de la adecuación del sistema cromatográfico se llevó a cabo inyectando seis veces una misma solución estándar de trabajo y determinando la repetibilidad instrumental y los parámetros de caracterización del pico de N-MIC.

Por otro lado, para conocer si las soluciones de N-MIC eran estables durante el período de tiempo usual de un análisis rutinario, se colocaron cuatro alícuotas de solución estándar de trabajo y otras cuatro de cada tipo de solución muestra en respectivos viales de inyección y se dejaron en la bandeja del inyector.

Cada solución se inyectó en intervalos de dos horas tomando en cada caso solución desde un vial nuevo y por un período total de seis horas. El área del pico de MIC obtenido en cada caso se comparó con el área del pico obtenido para la misma solución recién preparada, calculando un porcentaje respecto al área inicial.

2.5.7.3. Linealidad y rango

La linealidad del método se estudió tanto con las soluciones calibradoras en solvente como con las calibradoras en matriz a los fines de establecer el modelo de calibración más adecuado. Aplicando el método de los cuadrados mínimos se realizaron regresiones lineales de las áreas de los picos de MIC obtenidos con las

soluciones estándares de calibración vs la concentración (mg L^{-1}) nominal de cada uno de ellos y se obtuvieron las cifras de mérito.

Debido a que los rangos de concentración estudiados fueron del 50.0 al 150.0 % de las concentraciones esperadas para las muestras, en este trabajo no se determinaron LOD ni LOQ, tal como lo establecen las guías ICH para componentes mayoritarios.

2.5.7.4. Precisión y exactitud

La precisión se evaluó en los niveles de repetibilidad o intra-ensayo y precisión intermedia o inter-ensayo. Para el análisis de repetibilidad se procesaron seis porciones independientes de una muestra perfectamente homogeneizada de crema de N-MIC aplicando el procedimiento analítico completo y se obtuvieron los resultados de valoración para cada porción con los que se calculó la desviación estándar y el coeficiente de variación. Para estudiar la precisión intermedia, una nueva serie de seis porciones de la misma muestra fueron valoradas una semana mas tarde por otro analista. Finalmente, se aplicó una prueba *F* para comparar las variancias de las dos series.

Las soluciones de matriz fortificadas se utilizaron para evaluar la exactitud del método calculando las recuperaciones del N-MIC adicionado en cada nivel.

2.6. Resultados y discusión

2.6.1. Desarrollo del método

2.6.1.1. Extracción

Los químicos analíticos saben muy bien que la etapa preanalítica, es decir, aquella que incluye todos los pasos previos a los que es sometida la muestra antes de realizar la medición de la señal analítica, es en general la etapa más laboriosa y sujeta a errores de un proceso analítico (Valcarcel 1999). La estandarización de esta etapa, para ser incluida en métodos oficiales es también una cuestión delicada, debido a la gran variabilidad que se presenta habitualmente en las muestras reales.

Al aplicar los diversos procedimientos de solubilización propuestos por las farmacopeas para las cremas de N-MIC a las muestras en estudio, nos encontramos con que se producía una emulsión espumosa que no cambiaba de aspecto al

centrifugar y que filtraba con mucha dificultad por filtros de membrana. Además, se producía una precipitación tardía de excipientes en el vial de inyección, con el consiguiente riesgo de daño al instrumento o la columna analítica. Varios experimentos realizados con estos procedimientos arrojaron además, resultados de muy baja exactitud y precisión para la valoración de N-MIC.

Por el contrario, el procedimiento de extracción desarrollado y descrito anteriormente, aunque más largo y laborioso que el de las farmacopeas, resulta sencillo de implementar y es mucho más económico que los propuestos por otros autores como la EFS (Di Pietra y col 1992) o la extracción con fluidos supercríticos (Bonazzi y col 1998). Además, como se verá más adelante, con el mismo se obtuvieron excelentes resultados en los ensayos de recuperación y precisión.

2.6.1.2. Cromatografía

El uso de una fase estacionaria preparada con un soporte de sílica de altísima pureza recubierto en forma extra-densa y con doble bloqueo de los silanoles activos residuales (*double end-capping*), como en el caso de la fase estacionaria Zorbax utilizada, permite obtener buena retención de los compuestos neutros o de basicidad moderada, sin necesidad de recurrir al control de la ionización. Este hecho proporciona el beneficio de no requerir de soluciones reguladoras en la fase móvil, lo que a su vez se traduce en la gran ventaja de conseguir una rápida estabilización del sistema y de prolongar la vida útil de la columna, de los sellos de la bomba y otros constituyentes del cromatógrafo. Siendo el MIC un compuesto prácticamente neutro con $pK_a = 6.7$ (Al-Badr 2005), no se justifica la utilización de un acondicionador del pH en la fase móvil, tal como lo hacen los métodos oficiales. Es así que, en el método desarrollado la composición de la fase móvil quedó conformada por mezclas de solventes puros, sistema mucho más reproducible y fácil de obtener.

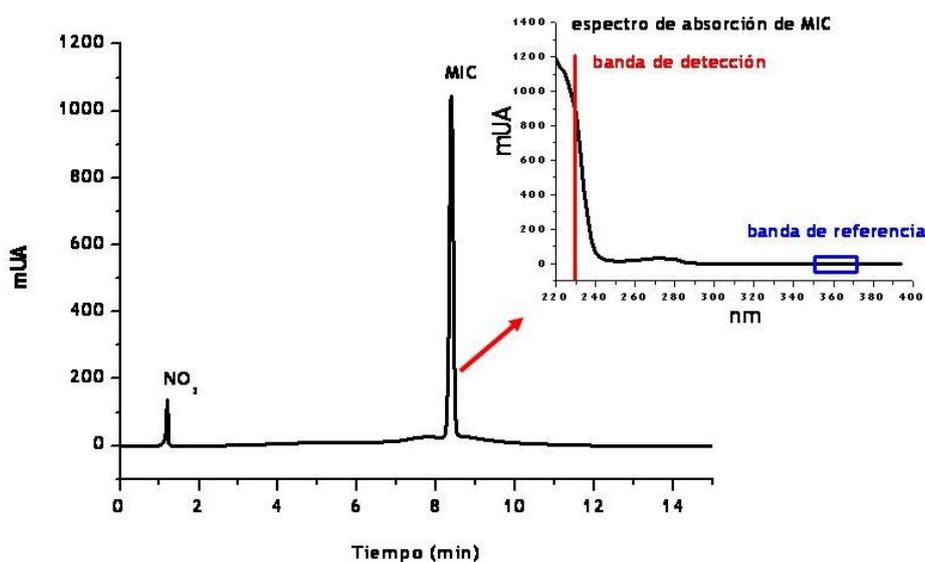
Mediante la realización de unas pocas experiencias durante el estudio de selectividad del método, se estableció el gradiente de elución que logró una excelente separación del MIC de los excipientes y de VB y sus productos de degradación. En estas condiciones el MIC eluye a un tiempo de retención de tan sólo 8.38 minutos. Sin embargo, el tiempo de análisis se estableció en 15.0 minutos totales para permitir la elución de potenciales productos de degradación y la re-estabilización del sistema a las condiciones iniciales.

2.6.2. Calibración y validación

2.6.2.1. Selectividad del método y estabilidad de las muestras

En el cromatograma del solvente de inyección no se observó ninguna señal significativa o distinta del ruido de la línea de base. Este resultado se debe a la gran ventaja que implica utilizar un solvente de inyección con la misma composición inicial de la fase móvil. Como puede verse en la Figura 2.3, en el cromatograma de la solución estándar de trabajo se presentan dos picos, el primero en el frente de corrida, correspondiente al ión nitrato y el segundo de mayor tamaño correspondiente al MIC con un tiempo de retención (t_R) de alrededor de 8.38 min.

Figura 2.3: Señal cromatográfica de la solución estándar



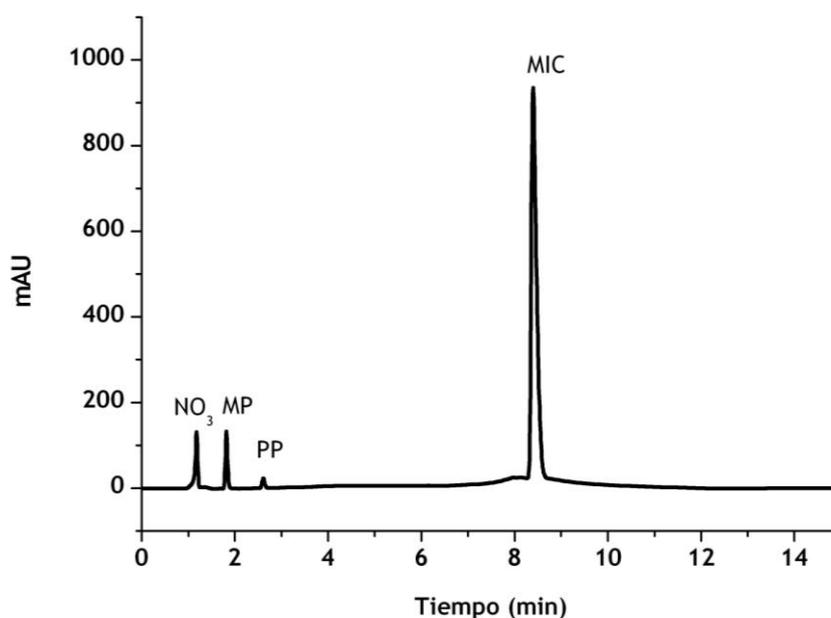
Cromatograma correspondiente a una solución estándar de N-MIC 0.53 mg mL^{-1} registrado a 232 (4) nm con referencia en 360 (100) nm.

En los cromatogramas de las soluciones de excipientes pudo comprobarse que sólo los conservantes metilparabeno (MP) y propilparabeno (PP) producían una señal apreciable a la longitud de onda de trabajo con $t_R = 1.80 \text{ min}$ y $t_R = 2.60 \text{ min}$ respectivamente. Sólo los picos correspondientes a estos dos compuestos se obtuvieron como respuesta en los cromatogramas de las muestras blanco, cuya identidad fue confirmada mediante la correlación de los t_R y de los espectros con los

de las soluciones de excipientes puros. No se observó en estos cromatogramas ningún pico en las inmediaciones del t_R de MIC.

En la Figura 2.4 puede apreciarse la excelente resolución lograda para el analito en las cremas de N-MIC.

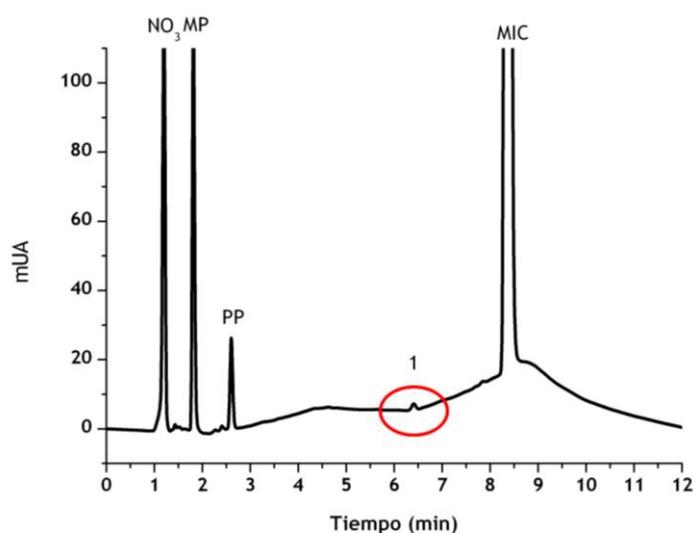
Figura 2.4: Señal cromatográfica de la solución muestra de crema



Por otro lado, en los cromatogramas de las muestras envejecidas de esta preparación no se observó disminución significativa de la cantidad de N-MIC recuperada y sólo en uno de los lotes apareció un pequeño pico adicional perfectamente resuelto respecto al pico principal (Figura 2.5). También la pureza de pico del analito se mantuvo intacta, lo que demuestra una muy buena estabilidad de esta preparación.

Las soluciones de VB produjeron un pico con $t_R = 5.0$ min, mientras que las de SG no produjeron ninguna señal, debido a que este antibiótico aminoglucósido no posee absorbancia en el ultravioleta. En la Figura 2.6 pueden observarse las señales producidas por las muestras envejecidas de cremas de N-MIC en asociación con VB y SG.

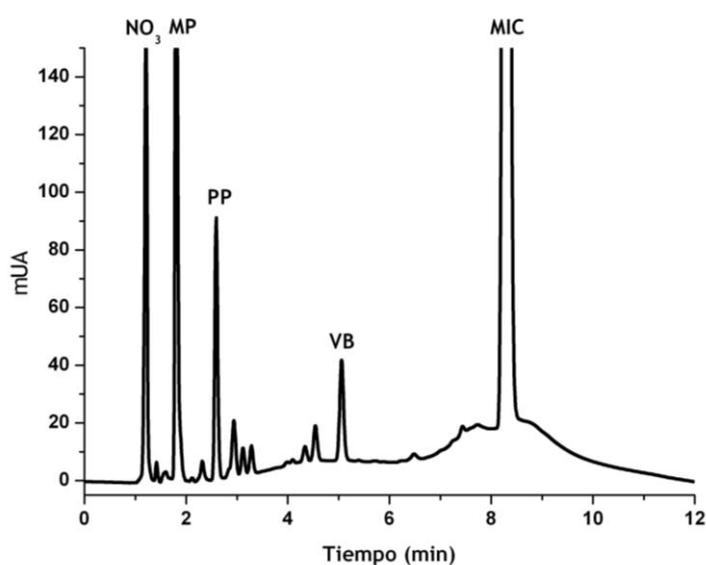
Figura 2.5: Cromatograma de una muestra envejecida de crema de N-MIC



Porción ampliada en la línea de base, se observa sólo un pequeño pico de un producto de degradación perfectamente resuelto.

Como puede apreciarse, la VB es altamente inestable en esta preparación produciéndose una disminución gradual y altamente significativa de su concentración y numerosos picos correspondientes a productos de degradación.

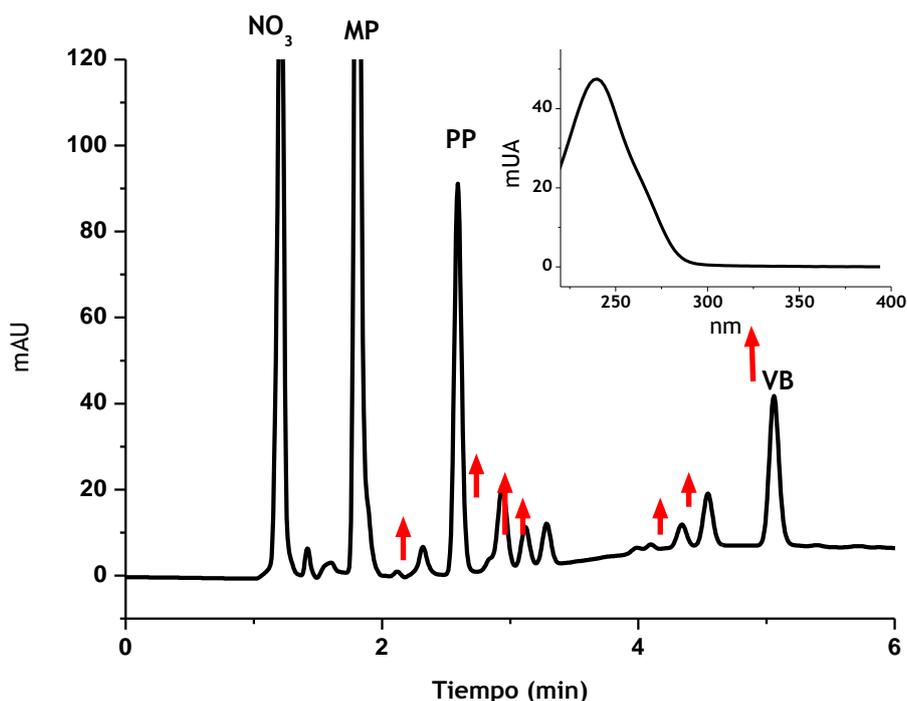
Figura 2.6: Cromatograma de una muestra envejecida de crema de N-MIC en asociación con VB y SG



Porción ampliada en la línea de base, se observa varios picos de productos de degradación, sin embargo el pico de MIC permanece perfectamente resuelto.

Mediante el análisis de los espectros de estos nuevos picos (Figura 2.7) pudo determinarse que todos ellos provenían de VB, mientras que el MIC nuevamente permanecía inalterado y con una excelente resolución.

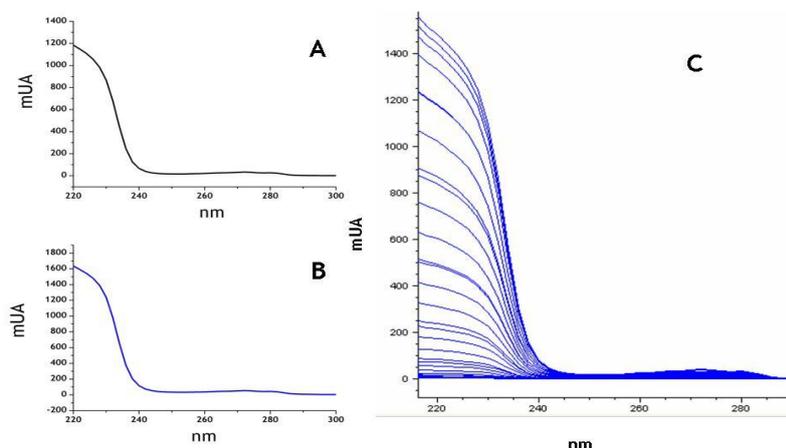
Figura 2.7: Estudio de los productos de degradación



Todos los picos secundarios presentaron alta correlación espectral con VB.

Finalmente, el estudio de pureza de pico demostró que había una correlación espectral de 99.96 % entre el espectro del pico de MIC en la solución estándar y el espectro del pico de MIC en la solución muestra (Figura 2.8). El factor de pureza para este pico, calculado en relación al espectro promedio resultó ser de 99.93% y en la evaluación de la gráfica de pureza de pico, la curva de similitud espectral permaneció por arriba de la curva umbral a lo largo de todo el pico.

Figura 2.8: Estudio de pureza de pico



- A: Espectro del pico de MIC en la solución estándar
 B: Espectro del pico de MIC en la solución muestra
 C: Todos los espectros registrados para el pico de MIC en la solución muestra

Este mismo estudio espectral de los picos del analito en la solución estándar y en la solución muestra se utilizó para asegurar la identificación del compuesto en las muestras.

2.6.2.2. Adecuación del sistema

Los parámetros que caracterizan al pico del analito se muestran en la Tabla 2.4, en donde puede verse que los mismos fueron adecuados con una excelente separación y forma de pico. La resolución (R) del pico de MIC no resultó ser un parámetro crítico, por lo que no fue necesario determinarla. Por otro lado, el coeficiente de variación de las áreas demostró que existe una excelente repetibilidad instrumental.

Tabla 2.4: Parámetros característicos del pico de MIC

| Parámetro | Resultado | Criterio de aceptación |
|-----------------------------------|------------------------------|------------------------|
| Tiempo de retención (t_R) | 8.38 min (0.18) ^a | -- |
| Número de platos teóricos (N) | 28 400 (0.52) | -- |
| Tailing (T) | 0.922 (0.90) | ≤ 2.0 |
| Factor de capacidad (K') | 3.94 (0.25) | ≥ 2.0 |
| Área (A) | 7794.2 (0.25) | $CV \leq 2.0$ |

^a El valor entre paréntesis indica el coeficiente de variación ($n=6$)

2.6.2.3. Estabilidad de las soluciones

El período de validez para las soluciones utilizadas en la valoración de materias primas, es el tiempo en el cual el área del pico del analito permanece entre el 99.0 y 101.0% del valor inicial. El criterio de estabilidad de soluciones para la valoración de preparaciones es un poco más amplio, permitiéndose una variación de $\pm 2.0\%$ del valor inicial.

Este estudio dio como resultado un mínimo de 6 horas de aptitud para la solución estándar y solución muestra de materias primas y un máximo de 4 horas para la solución muestra de cremas.

2.6.2.4. Linealidad y rango

Tabla 2.5: Parámetros de calibración

| Parámetro | Solvente | Matriz | Criterio de aceptación |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| Ordenada | -29 (76) ^a | 27 (122) ^a | |
| Intervalo de confianza de la ordenada (95% IC) | [-271; 212] | [-359; 414] | Incluye al 0 |
| Pendiente | 13500 (136) ^a | 13530 (145) ^a | |
| S de los residuos | 98 (0.70) ^b | 105 (0.77) ^b | CV \leq 2.0 |
| 1/ γ (mg L ⁻¹) | 0.00725 | 0.00774 | |
| Homogeneidad de las varianzas | $F_{cal} = 4.89$ | $F_{cal} = 2.00$ | $F_{crit} 2,2 (0.05) = 19.0$ |
| Falta de ajuste | $F_{cal} = 1.13$ | $F_{cal} = 1.01$ | $F_{crit} 13,10 (0.05) = 2.89$ |
| R ² | 0.999 | 0.996 | ≥ 0.99 |
| Comparación de pendientes | | $t_{cal}=1.24$ | $t_{crit} 26 (0.05) = 2.04$ |

^a el valor entre paréntesis indica desviación estándar

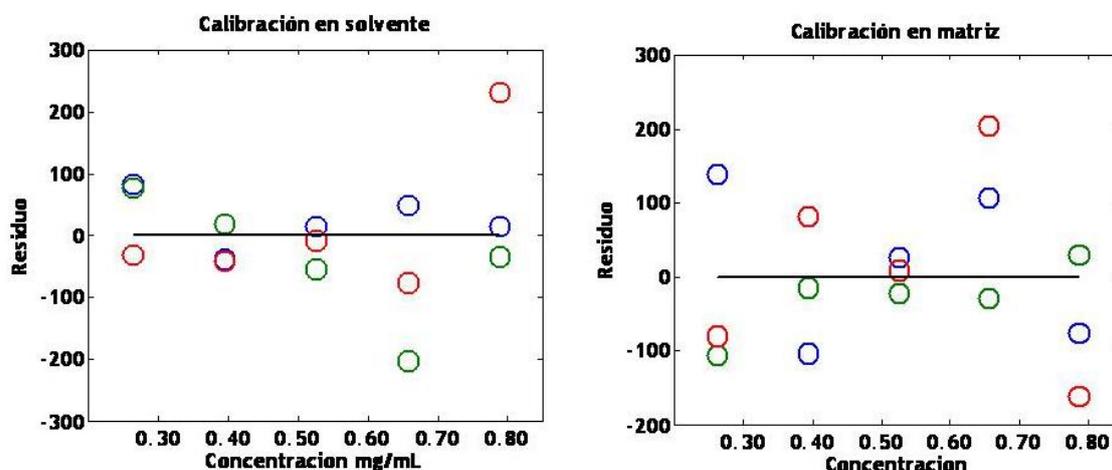
^b el valor entre paréntesis indica coeficiente de variación

En base a los resultados obtenidos en el estudio de selectividad que demostraron la ausencia de interferencias para el analito, se aplicó una la calibración univariada por regresión lineal simple para el método de cuantificación.

Los resultados de las regresiones, obtenidas por el método de los cuadrados mínimos, en solvente puro y en matriz y los criterios de aceptación aplicados se presentan en la Tabla 2.5.

Para verificar la adecuación de los datos al modelo lineal se evaluó la homocedasticidad de los mismos en forma visual inspeccionando una gráfica de distribución de los residuos en función de los niveles de calibración (Figura 2.9) y en forma estadística a través de una prueba F para comparación de varianzas en los extremos inferiores y superiores del rango. Como puede verse en la Tabla 2.5, la diferencia entre el valor observado y el valor crítico de F resultó ser no significativa ($\alpha=0.05$) para ambas calibraciones. De la misma manera, puede verse que la falta de ajuste al modelo lineal, evaluada en ambos casos mediante una prueba de ANOVA no fue significativa.

Figura 2.9: Distribución de los residuos



Los residuos presentan distribución homocedástica en ambos casos.

Para comparar las pendientes de ambas rectas de regresión se aplicó una prueba t que demostró que no hay diferencia estadísticamente significativa entre ellas, confirmando la ausencia de efecto matriz.

Los resultados de validación obtenidos en los estudios de linealidad y la ausencia de efecto matriz permitieron establecer un modelo de calibración basado

en el método de un único punto de calibrado con estándar externo para los análisis de rutina (Valcarcel 1999, Ermer 2001).

2.6.2.5. Precisión y exactitud

Como puede observarse en la Tabla 2.6, se obtuvieron muy buenos resultados de precisión y exactitud para el método, con cifras de mérito que cumplen ampliamente los criterios de aceptación convencionales.

Tabla 2.6: Cifras de mérito para precisión y exactitud

| Parámetro | Resultado | Criterio de aceptación |
|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| Precisión | | |
| Intra-ensayo (CV) | 0.58 | ≤ 2.0 |
| Inter-ensayo (CV) | 0.90 | ≤ 2.0 |
| Varianza entre series | $F_{cal} = 1.29$ | $F_{crit}_{5,5(0.05)} = 7.39$ |
| Exactitud | | |
| Recuperación (%) | | |
| Nivel=80.0% (n=3) | 102.2 (0.98) ^a | |
| Nivel=100.0% (n=3) | 99.5 (1.3) ^a | 98.0 - 102.0 % ^a |
| Nivel=120.0% (n=3) | 99.7 (1.0) ^a | CV ≤ 2.0 |
| Recuperación global (%) (n=9) | | |
| Diferencia del 100.0% | 100.5 (1.7) ^a | $t_{crit}_{8(0.05)} = 2.31$ |

^a el valor entre paréntesis indica coeficiente de variación

2.6.3. Aplicaciones

El método desarrollado y validado fue aplicado a la identificación, valoración y análisis de estabilidad de N-MIC en varios lotes de cremas de la empresa LAFORMED S.A., obteniéndose en todos los casos resultados dentro de las especificaciones de USP 32.

Los documentos correspondientes a los Procedimientos Operativos Estandarizados (POE) del método analítico y la validación fueron transferidos a la empresa productora.

2.7. Conclusiones

En el presente capítulo se presentó el desarrollo y la validación de un método analítico indicativo de estabilidad basado en cromatografía líquida para la valoración de N-MIC en materias primas y cremas dérmicas. Se propuso un procedimiento simple y económico de pretratamiento de muestra que arrojó excelentes resultados de recuperación permitiendo la separación de los compuestos lipofílicos que producían problemas de precipitación en el vial de inyección. En comparación con los métodos descritos en la literatura y en las farmacopeas, el sistema cromatográfico propuesto utiliza una fase móvil basada en solventes puros, sin necesidad de utilizar sales para regular el pH y obteniéndose picos de excelente simetría y resolución.

Mediante estudios de pureza de pico se demostró que el método es altamente selectivo, aun cuando se utilice en muestras degradadas, permitiendo una excelente resolución del pico correspondiente al analito de los picos de excipientes y productos de degradación.

La aplicación del método a las cremas que contienen VB permitió establecer la inestabilidad de este principio activo en la formulación estudiada, por lo que se concluye, que no se justifica completar el estudio de validación para ser aplicado a esta preparación.

El análisis de los resultados obtenidos en la calibración univariada permite concluir que el método tiene comportamiento lineal en el rango estudiado para la preparación farmacéutica y sin efecto matriz, con excelentes cifras de mérito. Basado en lo anterior, se puede proponer un procedimiento de calibración externa por un estándar único para los análisis de rutina, que resulta sumamente sencillo y económico.

Capítulo 3



**Nicarbazina en premezclas
coccidiostáticas**

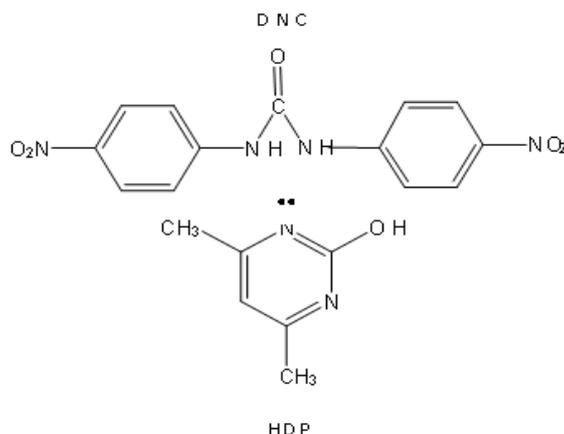
Diseño experimental

3.1. Nicarbazina

3.1.1. Características físico-químicas

Químicamente la **nicarbazina** (NIC) es un complejo equimolecular de 1,3-*N,N'*-bis(4-nitrofenil)urea y 4,6-dimetil-2(1 *H*)-pirimidona. Estos compuestos también son conocidos como **4,4'-dinitrocarbanilida** (DNC) y **2-hidroxi-4,6-dimetilpirimidina** (HDP), respectivamente. Forman entre ellos un complejo molecular del tipo dador-aceptor de electrones, comportándose como un par ácido-base de Lewis. Los grupos amida de la fenilurea, pobres en electrones, actúan como ácido de Lewis e interaccionan con los nitrógenos ricos en electrones del anillo de pirimidona, quien se comporta entonces como la especie básica. (Rogers y col 1983). En la Figura 3.1 puede apreciarse la estructura química de NIC y la interacción entre sus componentes.

Figura 3.1: Estructura química de la nicarbazina



El aspecto de NIC es el de un polvo fino de color amarillo medianamente oscuro. El complejo, como tal, es muy poco soluble en agua. Mientras que HDP tiene una solubilidad en este solvente mayor a 10^3 mg L^{-1} , DNC sólo se disuelve 0.02 mg L^{-1} (EFSA 2003).

Mediante microscopía electrónica se reveló que NIC forma cristales de tamaño microscópico, lo cuales al desintegrarse en agua no se solubilizan completamente, sino que tienden a formar cristales de menor tamaño compuestos por sólo por DNC (Rogers y col 1983).

3.1.2. Propiedades anticoccidiales

Desde su descubrimiento en la década de 1950 NIC ha sido utilizada como antibiótico por sus propiedades anticoccidiales, siendo esta la primera sustancia que logró generar un control satisfactorio de la coccidiosis.

La coccidiosis es una enfermedad producida por parásitos protozoarios microscópicos del género *Eimeria* que afecta a la mayoría de los animales criados comercialmente para fines alimenticios en todo el mundo. Particularmente son susceptibles las aves de corral, tales como pavos, patos, gallinas entre otras, pero también algunos mamíferos domésticos como ovejas, vacas y cerdos.

La cría intensiva de aves hace que los animales sean particularmente susceptibles a la enfermedad debido a las condiciones húmedas y cálidas de los galpones de crianza. Por el contrario la enfermedad es rara cuando las aves se crían en condiciones extensivas (Capurro y col 2005).

Luego de la ingesta de los oocytos del parásito por parte del animal, los mismos se desarrollan en el epitelio intestinal y se multiplican exponencialmente destruyendo las células de este tejido. El intestino dañado no puede absorber los nutrientes y se producen hemorragias. Esta combinación es generalmente fatal para el animal huésped, por lo que el desencadenamiento de una coccidiocis es altamente costoso para el productor, ya que puede perderse toda una camada de animales (Matabudul y col 2002).

La NIC ha sido empleada tanto en el tratamiento como en la prevención de la enfermedad, actuando en los estadios tempranos del desarrollo de los parásitos. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición del metabolismo mitocondrial del parásito, por lo que ha sido clasificada bioquímicamente como un **desacoplador de la fosforilación oxidativa** (Matabudul y col 2002).

3.1.3. Farmacocinética

Mientras que in-vitro DNC tiene por sí sólo una gran actividad anticoccidial, in vivo esta actividad se reduce considerablemente. Esto se debe a que, en medio acuoso, esta molécula forma agregados hidrofóbicos de hasta 20 μm de diámetro, que resultan demasiado grandes para ser absorbidos por el epitelio intestinal.

Hace tiempo se realizaron estudios que permitieron confirmar que el complejo DNC-HDP es 10 veces más potente en el control de *Eimeria* que el DNC por sí solo. Por otro lado, HDP no tiene ninguna actividad anticoccidial cuando se utiliza

sólo (Clucker y col 1955). Esta particularidad de NIC se debe a las propiedades físico-químicas del complejo demostradas por Roger y col.

La disolución del complejo en el intestino de las aves se asemeja al comportamiento de los cristales observado en el laboratorio. El ambiente acuoso del intestino causa que HDP comience a disolverse dejando libre al DNC. Aunque los cristales de DNC tienden a precipitar en estas condiciones, el HDP presente evita que se formen agregados demasiado grandes. De esta manera HDP asegura la biodisponibilidad del DNC, permitiendo que pueda absorberse en el epitelio intestinal en forma de pequeños cristales, dando como resultado una mejora en la actividad anticoccidial. Además, por su mayor solubilidad, HDP es rápidamente excretado del organismo a través de la orina, mientras que DNC es mucho más persistente, razón por la cual esta molécula es considerada como **residuo marcador** de NIC a monitorear en carne, hígado y huevos de aves de corral (JECFA 1998).

3.1.4. Efectos secundarios

Cuando NIC se suministra a las gallinas ponedoras se disminuye la producción de huevos, el peso de los mismos, su capacidad de eclosión, y se altera la pigmentación de la cáscara.

Suministrada a una dosis de 125 mg kg⁻¹ causa un 65% de reducción en la producción de huevos e inhibe completamente capacidad de eclosionar de los huevos fertilizados (Booth y col 1982).

Se ha postulado que el mecanismo por el cual NIC reduce la viabilidad de los huevos es inhibir la formación de la membrana vitelina que separa la clara de la yema, por lo que el embrión no puede desarrollarse (EPA 2005).

3.1.5. Usos y regulación

El uso de NIC como **aditivo alimentario** está aprobado por la Administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos (FDA, del inglés Food and Drug Administration), la Unión Europea (UE) en la Regulación 1831/2003/EC (EC 2003) y la legislación de muchos otros países. La misma puede utilizarse como monodroga o en combinación con otros ionóforos coccidiostáticos como la maduramicina amónica, la narasina o el clopidol, produciendo de esta manera un mejor control de la coccidiosis.

Se define como aditivo alimentario a toda sustancia, microorganismo o preparación, distinta al alimento, que intencionalmente se adiciona al mismo hasta una concentración máxima definida (mg kg^{-1} de alimento).

Tanto en Argentina, como en los países pertenecientes a las Naciones Unidas, se permite el uso de NIC en pollos en una dosis de 125 mg kg^{-1} suministrada a las aves menores de 28 días. Se asegura de esta manera un período sin ingesta de 9 días previos al consumo humano. Si se administra con otro activo la dosis permitida se reduce a $40\text{-}50 \text{ mg kg}^{-1}$ de alimento.

Por otro lado el uso de NIC no está permitido en gallinas ponedoras, debido a los efectos secundarios que se mencionaron.

El uso de aditivos en los alimentos juega un rol crucial en la cría intensiva de animales permitiendo un eficiente control de enfermedades y mayores índices de crecimiento en tiempos más cortos, por lo que los mismos actúan como **promotores de crecimiento**.

3.2. Premezclas

Una **premezcla** es una mezcla de un aditivo alimentario con un componente del alimento. Generalmente se preparan premezclas concentradas de NIC (8.0-25.0% p/p) con afrechillo o semita de trigo o maíz y algún vehículo inerte como, por ejemplo, carbonato de calcio. Estas premezclas no están destinadas para el consumo directo por parte de los animales, sino a ser mezcladas a su vez con la ración de alimento. Se recomienda generalmente que el productor agropecuario mezcle estas premezclas comerciales con un componente mayoritario de la alimentación como puede ser soja o maíz a los fines de asegurar una buena distribución de la misma y luego lo incorpore al resto de la partida de alimento.

En Sudamérica se comercializan varios productos de este tipo de similares características. Algunos de ellos se presentan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Premezclas comerciales con actividad anticoccidial

| Laboratorio productor | Nombre comercial | Composición |
|-----------------------|-------------------------------|---|
| Scope S.A. | Nicraminex | Nicarbazina 25 % |
| | Tausominex | Maduramicina Amónica 0.75 % Nicarbazina 8 % |
| FACYT S.R.L | Maduramicina + Nicarbazina | Maduramicina Amónica 0.75 % Nicarbazina 8 % |
| | Nicarbazina | Nicarbazina 20 % |
| Agropecuaria MH | DURACOX PLUS | Maduramicina de Amonica 0.75 % Nicarbazina 8 % |
| Biofarma | NICOX PLUS | Maduramicina Amónica 0.75 % Nicarbazina 8 % |
| Alpharma | Gromax | Maduramicina Amónica 0.75 % Nicarbazina 8 % |

3.3. El problema analítico

El control de calidad de las preparaciones anticoccidiales comercializadas por la industria de fármacos veterinarios es de suma importancia para asegurar la eficacia y seguridad de las mismas a través de la verificación de su correcta dosificación y estado de conservación.

La necesidad, entonces, de contar con métodos analíticos confiables y de sencilla aplicación se presenta tanto en la industria productora de insumos veterinario, como en los organismos de control, que deben realizar las auditorías y controles externos de los productos que salen a la venta.

En nuestro país, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) establece en la Resolución 482/2002 los requisitos que deben cumplir las empresas que elaboran productos veterinarios y dispone la implementación de la Norma de Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Veterinarios. En la misma se establece que todo productor debe contar con procedimientos escritos y validados para llevar a cabo el control de calidad de sus productos (SENASA 2002).

Concretamente, la determinación de NIC en premezclas representa un importante desafío para el analista que debe enfrentarse a la necesidad de determinar dos componentes con características físico-químicas muy distintas e inmersos en una matriz compleja y variable.

3.3.1. Antecedentes

Es llamativo que, aún cuando se ha demostrado que el HDP juega un importante rol en la biodisponibilidad del DNC, los métodos publicados en la literatura para la determinación de NIC en pre-mezclas y en alimentos, están basados en la valoración exclusivamente del DNC.

Así, el DNC ha sido determinado en alimentos y premezclas por CLAR-UV en fase reversa de manera isocrática (Macy y Loh 1984, Krabel y col 2000), en columna micro-bore con detección en el UV (Draisci y col 1995) y por CLAR-MS utilizando el analito deuterado como estándar interno (Cannavan y col 1999).

La estrategia de determinar sólo el DNC es muy razonable cuando se realizan monitoreos de residuos, ya que, como se comentó antes, la molécula de DNC es mucho más persistente en los tejidos que el HDP.

Con este objetivo se han publicado numerosos métodos para la determinación de residuos de DNC en distintas matrices utilizando LC, como por ejemplo, en huevo y en músculo luego de extraerlo por medio de fluidos supercríticos (Matabudul y col 1999), o en huevo y en hígado de pollo por CLAR- electrospray MS-MS (Yakkundi y col 2001) e incluso en heces (Stahl y Johnston 2002). También se ha extraído de hígado de pollo, purificándolo y pre-concentrándolo por medio de extracción en fase sólida antes de determinarlo por CLAR (Capurro y col 2005).

Recientemente se han desarrollado algunos métodos de los denominados **multi-residuos**, en los que se logra determinar simultáneamente varios residuos de fármacos en una misma matriz, incluyendo entre ellos al DNC (Olejnik y col 2009, Matabudul y col 2002). Estos métodos utilizan detectores de masa de doble cuadrupolo.

Sin embargo, no se han publicado últimamente en revistas internacionales métodos que determinen simultáneamente ambos componentes de NIC en aditivos alimentarios, premezclas o alimentos.

Se puede suponer, que la causa por la cual no se han desarrollado este tipo de métodos, sea que las características físico-químicas de ambos compuestos son muy diferentes. Particularmente, para la CLAR en fase reversa el DNC no representa un analito difícil de separar, mientras que por el contrario, las características altamente polares y básicas del HDP, hacen que el mismo no se retenga adecuadamente utilizando las fases móviles convencionales.

3.3.2. Selección de la metodología

La Cromatografía Líquida de Apareamiento Iónico (CLAI) es una alternativa accesible que puede utilizarse para la separación de compuestos iónicos o ionizables, como es el caso del HDP. La principal ventaja de esta técnica es que no requiere de equipamiento o de una fase estacionaria especial, sino que se lleva a cabo con las tradicionales de octilsilano u octadesilsilano utilizadas en la clásica cromatografía de fase reversa. La selectividad se logra manipulando la composición de la fase móvil posibilitando la separación simultánea de compuestos neutros e iónicos (Poole 2003).

Cuando se desarrolla un método por CLAI debe considerarse que hay muchas variables que afectan la retención y la selectividad de esta técnica. Las más importantes de ellas son el tipo y concentración del agente de apareamiento iónico utilizado, el pH y la fuerza iónica de la fase móvil, como así también la concentración y el tipo de solvente orgánico utilizado como modificador. Otros factores a tener en cuenta son las propiedades de la fase estacionaria y la temperatura. La influencia de estas variables sobre los parámetros cromatográficos es muy frecuentemente no lineal y además son interdependientes unas de otras. Esto hace que sea imposible la elaboración de modelos simples o intuitivos para lograr el ajuste del sistema y se necesite, por lo tanto, de la ayuda del diseño experimental para lograr la mejor selección de los niveles para los factores.

3.4. Objetivos

Los objetivos del presente capítulo de tesis fueron:

- Desarrollar un método por CLAI para su utilización en la determinación simultánea de HDP y DNC, como componentes de NIC, en materias primas y premezclas comerciales de acción anticoccidial, que contenían también maduramicina amónica en su formulación.
- Utilizar el **diseño experimental** para optimizar eficientemente el sistema cromatográfico en estudio. Evaluar distintos tipos de diseños, elaborar modelos de segundo orden a través de la **metodología de la superficie de respuesta** y aplicar la **función deseabilidad** para encontrar la mejor combinación para los valores de las variables.
- Evaluar las características de rendimiento del método desarrollado aplicando un procedimiento completo de **validación**.

3.5. Materiales y métodos

3.5.1. Instrumental y *softwares*

Todas las experiencias se llevaron a cabo utilizando un cromatógrafo líquido Agilent Serie 1100 fabricado en Waldbron, Alemania. El mismo consta de una bomba cuaternaria, desgasificador de membrana, horno de columna termostatzado, inyector automático y detector UV-Vis con arreglo de diodos.

Para la adquisición y procesamiento de datos cromatográficos se utilizó el *software* Chemstation versión B 0103 de Agilent.

La columna empleada como fase estacionaria fue una INERSTIL-ODS-3 (4.6 x 150 mm, 5 µm de diámetro de partícula) de GL Science.

El programa Stat-Ease Design-Expert Versión 7.0.0 se utilizó para realizar el diseño experimental, el modelado de las superficies de respuesta y los cálculos de la función deseabilidad.

3.5.2. Reactivos

La nicarbazina (CAS 330-95-0) empleada como estándar analítico se obtuvo de Sigma -Aldrich (St Louis, Estados Unidos) con una composición de 68.0% p/p de DNC y 28.9% p/p de HDP. La N,N-dimetilformamida grado p.a. se obtuvo de Anedra (San Fernando, Argentina), el 1-hepatanosulfonato de sodio de F.J.T. Baker (Phillipsburg, Estados Unidos), mientras que el acetato de sodio y el ácido acético grado p.a. fueron de Cicarelli (San Lorenzo, Argentina). Los solventes empleados para la fase móvil, acetonitrilo (ACN) y metanol (MeOH), grado cromatográfico fueron obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania). El agua empleada fue agua ultrapura obtenida en un equipo Milli-Q Biocel System de Millipore SAS (Molsheim, Francia) en nuestro laboratorio.

3.5.3. Muestras

Las muestras con las que se trabajó fueron materias primas de NIC y premezclas anticoccidiales provistas por una industria local de productos veterinarios: FACYT, S.A. Las preparaciones empleadas fueron de "Maduracimina-Nicarbazina" conteniendo 8.0%p/p de NIC y 0.75% p/p de maduramicina amónica respectivamente.