



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Farmacia  
Programa de Doctorado en Ciencias y Tecnología Analítica

DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE METODOLOGÍAS  
ESPECTROSCÓPICAS Y QUIMIOMÉTRICAS PARA CONTROLES DE  
CALIDAD Y DE PROCESOS PRODUCTIVOS DE MEDICAMENTOS EN LA  
INDUSTRIA FARMACÉUTICA

Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias y Tecnología Analítica



CESAR LORENZO PINO TORRES  
CONCEPCIÓN-CHILE

2020

Profesora Guía: Rosario Castillo Felices  
Profesor Guía externo: Carlos Peña Farfal  
Dpto. de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia  
Universidad de Concepción

## *Agradecimientos*

*Antes de presentar la memoria escrita del trabajo realizado en estos últimos años, me es menester hacer mención en agradecimiento a todas aquellas personas que, directa o indirectamente, hicieron posible que este proyecto se concrete, ya sea con un consejo o con una crítica, familiares, amigos, compañeros y profesores, la culminación de esta tesis doctoral no habría sido posible sin su orientación, apoyo y colaboración, a todos ustedes, muchas gracias.*

*César*



## Índice

<b>Índice de figuras.....</b>	<b>5</b>
<b>Índice de tablas .....</b>	<b>10</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>11</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>13</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA Y SUS CONTROLES DE CALIDAD.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2 ESPECTROSCOPIA NIR .....</b>	<b>22</b>
1.2.1 HISTORIA .....	22
1.2.2.....	
FUNDAMENTOS .....	25
1.2.3 INSTRUMENTACION.....	29
1.2.4 APLICACIONES.....	34
<b>1.3 ESPECTROSCOPIA RAMAN.....</b>	<b>35</b>
1.3.1 HISTORIA .....	35
1.3.2 FUNDAMENTOS .....	36
1.3.3 INSTRUMENTACIÓN.....	38
1.3.4 APLICACIONES.....	43
<b>1.4.....</b>	<b>44</b>
<b>QUIMIOMETRÍA.....</b>	<b>44</b>
1.4.1 ORIGENES DE LA QUIMIOMETRÍA.....	44
1.4.2 MODELOS CUALITATIVOS .....	46
1.4.3 MODELOS CUANTITATIVOS .....	52
1.4.4 ETAPAS DE MODELADO .....	55
<b>1.5 ENFOQUE DE ESTUDIO.....</b>	<b>63</b>
<b>1.6 REFERENCIAS.....</b>	<b>71</b>
<b>2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>85</b>
<b>2.1. HIPOTESIS.....</b>	<b>86</b>
<b>2.2. OBJETIVOS.....</b>	<b>87</b>
2.2.1. OBJETIVO GENERAL .....	87
2.2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	87

<b>3. ESTRATEGIA ANALÍTICA DESARROLLADA .....</b>	<b>88</b>
<b>3.1. INSTRUMENTACIÓN ESPECTROSCÓPICA Y EQUIPOS FARMACÉUTICOS .....</b>	<b>89</b>
<b>3.2. MÉTODOS DE REFERENCIA .....</b>	<b>90</b>
<b>3.3. METODOLOGIA DE ANÁLISIS.....</b>	<b>91</b>
<b>4. DETERMINACION DE LA HOMOGENEIDAD DE MEZCLADO MEDIANTE EL USO DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS Y DISTINTAS ESTRATÉGIAS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>94</b>
<b>4.1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>95</b>
<b>4.2. EXPERIMENTAL .....</b>	<b>95</b>
4.2.1. DESARROLLO DEL MODELO CUANTITATIVO NIR .....	95
4.2.2. PRETRATAMIENTO ESPECTRAL .....	98
4.2.3. PROCESO DE MEZCLADO .....	98
4.2.4. DETECCIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO DE MEZCLADO .....	99
<b>4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>107</b>
4.3.1. ESPECTROSCOPÍA NIR .....	108
4.3.2. ESPECTROSCOPÍA VIS-NIR.....	117
4.3.3. DETERMINACION DEL TIEMPO ÓPTIMO DE MEZCLADO .....	122
<b>4.4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>144</b>
<b>4.5. REFERENCIAS.....</b>	<b>145</b>
<b>5. USO DE ESPECTROSCOPÍA NIR Y RAMAN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS EN COMPRIMIDOS FARMACÉUTICOS TERMINADOS</b>	<b>147</b>
<b>5.1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>148</b>
<b>5.2. EXPERIMENTAL .....</b>	<b>148</b>
5.2.1. DESCRIPCION DE LAS MUESTRAS.....	148
5.2.2. PREPARACION DE LAS MUESTRAS DE CALIBRACIÓN .....	149
5.2.3. PREPARACION DE LAS MUESTRAS DE VALIDACIÓN .....	149
5.2.4. REGISTRO ESPECTRAL .....	150
5.2.5. ANÁLISIS DE DATOS Y DESARROLLO DE MODELOS QUIMIOMÉTRICOS. ....	151
5.2.6. EXACTITUD Y PRECISIÓN DE LA METODOLOGÍA.....	152
5.2.7. METODO DE REFERENCIA .....	153
<b>5.3. RESULTADOS .....</b>	<b>154</b>
5.3.1. ESTUDIOS PRELIMINARES .....	154
5.3.2. DESARROLLO Y EVALUACIÓN ANALITICA DE LOS MODELOS DESARROLLADOS	170
5.3.3. EFECTO DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA .....	178
<b>5.4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>185</b>
<b>5.5. REFERENCIAS.....</b>	<b>186</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>188</b>

## Índice de figuras

Figura 1-1: Principales etapas de la fabricación de un comprimido farmacéutico.....	16
Figura 1-2: Espectro electromagnético con los fenómenos asociados a cada región.....	24
Figura 1-3: Diagrama de los niveles de energía de un átomo o molécula.....	26
Figura 1-4. Diagrama de energía de los modelos vibracionales de las moléculas.....	28
Figura 1-5: Esquema de las tres geometrías de iluminación en espectrómetros NIR.....	33
Figura 1-6: Diagrama de los fenómenos de Absorción IR y NIR, efecto Raman y fluorescencia....	38
Figura 1-7: Geometrías de iluminación en espectroscopía Raman.....	40
Figura 1-8: Representación gráfica de la reducción de variables llevada a cabo por un PC.....	48
Figura 1-9: Esquema general del proceso de modelado para técnicas espectroscópicas multivariantes.....	55
Figura 1-10: Esquema del muestreo segregado.....	66
Figura 1-11: Explicación de los conceptos de heterogeneidad constitucional y heterogeneidad distribucional.....	68
Figura 1-12: Interrelaciones entre los 5 errores básicos de muestreo.....	69
Figura 3-1: Esquema de los mecanismos por el cual se detectó el tiempo óptimo de mezclado.....	92

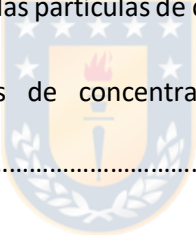
Figura 3-2: Esquema de los mecanismos por el cual se construyeron las metodologías cuantitativas NIR y Raman .....	93
Figura 4-1: Representación gráfica de las concentraciones de cada API incluidas en el set de calibración y validación.....	97
Figura 4-2: A) Zonas del mezclador en donde se realizaron los muestreos y registros espectrales; B) Muestreador tipo lanza utilizado por la industria farmacéutica para realizar muestreos.....	100
Figura 4-3: Mecanismo para la obtención de espectros Vis-NIR posterior al muestreo segregado. Acondicionamiento de la sonda para los registros desde el interior del mezclador.....	102
Figura 4-4: Configuración experimental del instrumento para el análisis del proceso de mezclado de manera continua.....	103
Figura 4-5: Representación de los espectros crudos tratados provenientes de cada API y de una matriz de excipientes.....	109
Figura 4-6: Distribución espacial de las muestras de calibración en relación a los tres primeros componentes principales obtenidos al realizar un PCA sobre la totalidad del conjunto.....	111
Figura 4-7: Comparación del espectro de los componentes puros de cada API con la representación lineal del loading del PC1 obtenidos a partir de los modelos PLS NIR.....	112
Figura 4-8: Comparación gráfica de los valores de concentración predichos mediante los modelos PLS desarrollados con los valores de referencias de cada API.....	115
Figura 4-9: Comparación de los espectros puros de cada API con la representación lineal de los coeficientes de regresión del primer PC obtenidos en los modelos PLS.....	116

Figura 4-10: Espectros de cada API y de una matriz de excipientes crudos y pretratado.....	118
Figura 4-11: Distribución espacial de los scores sobre los 4 primeros componentes principales obtenidos al realizar un PCA sobre los espectros de cada API y la matriz de excipientes.....	119
Figura 4-12: Representación lineal de los loading de los tres primeros PC junto con los espectros de los APIs y de la matriz de excipientes.....	121
Figura 4-13: Evaluación de la homogeneidad del mezclado cuantitativamente mediante espectroscopía NIR.....	123
Figura 4-14: Evaluación de la homogeneidad del mezclado cualitativamente mediante espectroscopía Vis-NIR utilizando MBSD.....	125
Figura 4-15: Evaluación de la homogeneidad del mezclado cualitativamente mediante espectroscopía Vis-NIR utilizando DIS-ATS y DMBA-TS.....	127
Figura 4-16: Evaluación de la homogeneidad del mezclado cualitativamente mediante espectroscopía Vis-NIR utilizando MBSD de scores provenientes del PCA aplicado sobre los espectros del proceso.....	129
Figura 4-17: Distribución espacial de los scores respecto a los dos primeros PC obtenidos al aplicar un PCA sobre los espectros del proceso de mezclado.....	131
Figura 4-18: Distribución espacial de los scores respecto a los dos primeros PC obtenidos al aplicar un PCA sobre los espectros de predicción y 10 espectros de calibración.....	132
Figura 4-19: Evaluación de la homogeneidad del mezclado cualitativamente mediante espectroscopía Vis-NIR utilizando grafico Hotelling's $T^2$ .....	133

Figura 4-20: Evaluación de la homogeneidad del mezclado cualitativamente mediante espectroscopía Vis-NIR utilizando DIS-ATS, DMBA-TS y MBSD de scores.....	135
Figura 4-21: Distribución espacial de los scores en relación al PC1 y PC2 obtenidos del PCA aplicado sobre el conjunto de datos espectrales adquiridos desde el exterior del mezclador....	138
Figura 4-22: Monitorización del proceso de mezclador mediante MBSD y DIS-ATS.....	141
Figura 4-23: Monitorización del proceso de mezclador mediante el análisis de score respecto a una referencia.....	142
Figura 4-24: Monitorización del proceso de mezclador mediante el análisis de score respecto a una referencia.....	143
Figura 5-1: Esquema de la adquisición espectral Raman.....	151
Figura 5-2: Representación de los espectros crudos y tratado.....	155
Figura 5-3: Gráfica bidimensional de la distribución de los scores en relación al PC1 y PC2 del PCA realizado sobre las tabletas de distinta masa y grosor.....	156
Figura 5-4: Espectros crudos y pretratados de muestras comerciales y muestras lab-made a concentraciones nominales de cada componente.....	158
Figura 5-5: Comparación de los espectros puros de cada API con el espectro crudo de un comprimido comercial. Efecto del pretratamiento espectral aplicado sobre el set de calibración.....	162
Figura 5-6: Gráfica bidimensional de la distribución de los scores en relación al PC1 y PC2 del PCA realizado sobre el set de calibración y muestras comerciales.....	164



Figura 5-7: Espectros Raman de los tres ingredientes activos y la tableta comercial. 8 espectros Raman de la misma tableta comercial recompactada en diferentes zonas.....	167
Figura 5-8:Gráfica bidimensional de la distribución de los scores de espectros Raman en relación al PC1 y PC2 del PCA realizado sobre el set de calibración y muestras comerciales. Representación lineal el loading del PC1, frente los espectros Raman de una muestra comercial y de una muestra lab-made a concentraciones nominales.....	169
Figura 5-9: Espectro de componentes puros de cada API y la representación lineal de los coeficientes de regresión de los modelos PLS NIR.....	175
Figura 5-10: Espectro Raman de los componentes puros de cada API y la representación lineal de los coeficientes de regresión de los modelos PLS Raman.....	177
Figura 5-11: Imágenes microscópicas de las partículas de cada API.....	181
Figura 5-12: Histogramas de valores de concentraciones individuales de 25 tabletas comerciales.....	183



## Índice de tablas

Tabla 1-1: Aplicaciones PAT de las espectroscopías NIR y Raman para procesos farmacéuticos.....	22
Tabla 4-1: Características de la metodología HPLC utilizada como método de referencia.....	87
Tabla 4-2: Cifras de mérito obtenidas en las predicciones de los mejores modelos PLS desarrollados para cada API.....	113
Tabla 4-2: Análisis estadístico para el promedio de factores ( $F$ ) a cada longitud de onda obtenido a partir de 5 experimentos.....	139
Tabla 5-1: Efecto de pretratamientos en las diferencias espectrales entre muestras comerciales y compactadas en el laboratorio y el coeficiente de correlación.....	160
Tabla 5-2: Coeficientes de correlación para cada API respecto a una tableta comercial para ambas técnicas después de aplicar diferentes métodos de preprocesamiento.....	168
Tabla 5-3: Cifras de mérito de los modelos NIR y Raman PLS para ácido acetilsalicílico, cafeína y paracetamol, el conjunto de calibración incluyó 36 tabletas hechas en laboratorio con 10 y 5 tabletas comerciales para NIR y Raman respectivamente.....	171
Tabla 5-4: Comparación de los valores hallados de contenido en API mediante los modelos desarrollados con los valores HPLC de referencia.....	184
Tabla 5-5: Valor de precisión expresado como % RSD obtenido con los modelos PLS NIR y Raman.....	178
Tabla 5-6: Tamaño y números de partículas (n) para cada componente de la tableta.....	181

## Resumen

La industria farmacéutica es un sector industrias que necesita estar en constante evolución en cuanto a tecnologías de análisis se refiere. Esto le permite crecer de forma exitosa, optimizar la productividad de los análisis y cumplir con las especificaciones que los organismos reguladores demandan para la calidad requerida de los productos. En este contexto, la industria farmacéutica demanda técnicas analíticas que cumplan con las características mencionadas, incluyendo metodologías rápidas, sencillas y que garanticen resultados confiables

Las técnicas espectroscópicas, en especial la espectroscopía de infrarrojo cercano y la espectroscopía Raman, presentan una serie de ventajas en relación a las técnicas instrumentales convencionales utilizadas por el sector industrial, como lo son las cromatográficas. Dentro de estas ventajas se destaca la rapidez de los análisis, puesto que no es necesario el tratamiento de la muestra, la ausencia de consumo de reactivos, la mínima formación del personal de laboratorio y el bajo coste de mantenimiento. El desarrollo de nuevos métodos analíticos basados en técnicas espectroscópicas para ser utilizadas en el control del proceso y ensayos de la calidad de los productos finales, es el principal objetivo de este trabajo de investigación.

Bajo esta premisa se realizó un estudio crítico de distintos métodos cualitativos y cuantitativos aplicables en la monitorización del proceso de mezclado farmacéutico y la detección de su punto final mediante espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS)

y espectroscopía Vis-NIR. El estudio reveló información importante respecto al avance tecnológico para estas tareas, ayudando a definir el método más adecuado para determinar el punto final en los procesos de mezclas estudiados, ya que no todos los métodos obtuvieron la misma sensibilidad ni la misma facilidad de implementación, característica relevante para análisis en línea.

Respecto a las metodologías cuantitativas para el análisis de comprimidos farmacéuticos terminados, los resultados mostraron que los modelos desarrollados para espectroscopía NIR y Raman poseen una capacidad predictiva adecuada con los requerimientos exigidos por los organismos reguladores. Por lo que las metodologías desarrolladas se han aplicado para la determinación de la uniformidad de las unidades de dosificación en dos lotes comerciales. Además, la aplicación de espectroscopía Raman permitió la detección de una distribución inapropiada de ingredientes activos en productos farmacéuticos.

Los estudios realizados en esta tesis proporcionaron un conjunto de pautas metodológicas basadas en técnicas espectroscópicas para realizar el control de parámetros críticos en la producción de comprimidos farmacéuticos, demostrando la factibilidad para ser utilizadas en controles de rutinas o de calidad en los laboratorios de producción.

## Abstract

The pharmaceutical industry is an industry sector that needs to be constantly evolving in terms of analysis technologies. This allows it to grow successfully, optimize the productivity of analyzes, and meet the specifications that regulatory bodies demand for the required quality of products. In this context, the pharmaceutical industry demands analytical techniques that meet the aforementioned characteristics, including quick, simple methodologies and that guarantee reliable results.

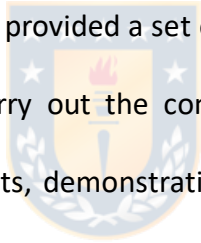
Spectroscopic techniques, especially near infrared spectroscopy and Raman spectroscopy, have a number of advantages in relation to conventional instrumental techniques used by the industrial sector, such as chromatography. Among these advantages, the speed of analyzes stands out, since the sample treatment is not necessary, the absence of reagent consumption, the minimal training of laboratory personnel and the low maintenance cost. The development of new analytical methods based on spectroscopic techniques to be used in process control and quality testing of final products is the main objective of this research work.

Under this premise, a critical study of different qualitative and quantitative methods applicable in the monitoring of the pharmaceutical mixing process and the detection of its end point by means of near infrared spectroscopy (NIRS) and Vis-NIR spectroscopy were carried out. The study revealed important information regarding technological progress for these tasks, helping to define the most appropriate method to determine

the end point in the mixing processes studied, since not all methods obtained the same sensitivity or the same ease of implementation, a characteristic relevant for online analysis.

Regarding the quantitative methodologies for the analysis of finished pharmaceutical tablets, the results showed that the models developed for NIR and Raman spectroscopy possess an adequate predicative capacity with the requirements demanded by regulatory bodies. Therefore, the developed methodologies have been applied to determine the uniformity of the dosage units in two commercial batches. Furthermore, the application of Raman spectroscopy allowed the detection of an inappropriate distribution of active ingredients in pharmaceutical products.

The studies carried out in this thesis provided a set of methodological guidelines based on spectroscopic techniques to carry out the control of critical parameters in the production of pharmaceutical tablets, demonstrating the feasibility of being used in routine or quality controls in production laboratories.



# Capítulo I

## **1. INTRODUCCIÓN**



## **1.1 LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA Y SUS CONTROLES DE CALIDAD**

La industria farmacéutica es uno de los sectores más regulados en el campo industrial debido a la importancia de sus productos sobre la salud de los consumidores. Un medicamento o producto farmacéutico tiene como función principal diagnosticar, prevenir o curar algún tipo de patología, de manera tal que quien lo consuma, después de un determinado tratamiento, vuelva a un estado fisiológico. Para que el producto logre su propósito farmacológico, la industria farmacéutica, antes de liberarlo al mercado, debe realizar un conjunto de ensayos físicos y químicos sobre las materias primas, los productos intermedios y principalmente sobre el producto acabado, y así garantizar la efectividad y la seguridad del medicamento. Para ello, organismos nacionales como el Instituto de Salud Pública (ISP) o internacionales como la Food and Drugs Administration (FDA) aparecen como ejemplos de entidades reguladoras encargadas de establecer los lineamientos y parámetros requeridos para calificar producto como apto o no para el consumo humano. En ese contexto, los laboratorios farmacéuticos han adoptado algunos documentos formales, como las Farmacopeas o las guías de calidad de la International Conference on Harmonisation (ICH) Q2 y Q8 (1,2), como pautas para el desarrollo de metodologías analíticas necesarias para llevar a la práctica las pruebas de calidad demandada por dichas entidades.

Actualmente, podemos encontrar una amplia gama de formas farmacéuticas agrupadas en tres grandes grupos; las formas farmacéuticas sólidas (polvos,



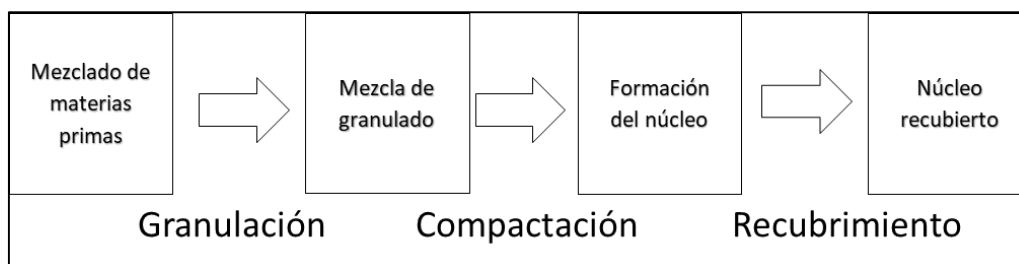
granulados, comprimidos, cápsulas), formas farmacéuticas semisólidas (cremas, geles, supositorios) y formas farmacéuticas líquidas (jarabes, colirios, aerosoles). De estas presentaciones, los comprimidos o tabletas son las que ocupan un mayor porcentaje en las prescripciones médicas (3), y por consiguiente, son los productos de mayor demanda productiva y económica para la industria, lo que genera un interés adicional para la innovación en el campo de la tecnología farmacéutica. Siendo puntuales, un comprimido farmacéutico debe ser sometido a los siguientes análisis; ensayo de identidad de los componentes, ensayo de disolución, ensayo de friabilidad, análisis del contenido de impurezas, ensayo de uniformidad de dosis y el más importante, el análisis de uniformidad de mezclado. La mayor parte de estos ensayos requieren un análisis cuantitativo del principio activo (API, *Active Pharmaceutical Ingredients*), en donde es necesario la utilización de metodologías analíticas validadas para llevarlos a cabo. Estas metodologías suelen ser en base a técnicas instrumentales como HPLC, GC o UV-Vis, y conlleva la retirada de parte del material de producción para el consiguiente análisis en el laboratorio, que puede situarse lejos del proceso (off-line) o en la misma planta de producción (at-line). Asimismo, todas estas técnicas requieren preparación de la muestra que, junto con el tiempo de análisis, supone entre media hora (UV) y varias horas en algunos ensayo de disolución (4), además de un elevado consumo de disolventes. Por otra parte, el gran número de muestras a analizar para maximizar la representatividad de los análisis, así como el gran número de parámetros a determinar

en cada muestra para asegurar la calidad del producto final en todos los sentidos, implican una gran inversión en tiempo y dinero. En respuesta a este problema, la FDA en 2004 planteó una nueva filosofía de trabajo denominada Tecnología Analítica de Procesos (*PAT, Process Analytical Technology*), en la que se propone cambiar el enfoque de los controles de calidad e incentivar en última instancia la comprensión de los procesos y la gestión de la calidad.

La iniciativa PAT nace con el objetivo de *“to enhance understanding and control the manufacturing process, which is consistent with our current drug quality system: quality cannot be tested into products; it should be built-in or should be by design”* (5).

Para entender la filosofía PAT en el proceso de producción farmacéutica debemos conocer a grandes rasgos en que consiste este proceso. La fabricación de un comprimido comprende un conjunto de etapas en donde tanto los excipientes como los APIs son sometidos a una serie de procesos físicos secuenciales (6), según se muestra en la Figura 1-1.

**Figura 1-1:** Principales etapas de la fabricación de un comprimido farmacéutico.



Como se muestra en la figura 1-1 la fabricación de un comprimido se puede dividir básicamente en cuatro etapas. La etapa de mezclado es sin duda la más crucial y generalmente es la que más tiempo demanda, ya que las mezclas de materias primas, principalmente en estado pulverulento, deben estar completamente homogéneas para garantizar la correcta dosificación de cada comprimido en el lote de producción (7). Para asegurar esta homogeneidad es necesario medir la concentración del API en determinados intervalos de tiempo y en distintas zonas del mezclador. El momento en que la concentración del API se mantiene constante con una determinada desviación estándar, se considera una mezcla homogénea y el proceso se da por terminado.

Con el fin de aumentar el tamaño de partículas y mejorar la compactación, luego del mezclar las materias primas estas son sometidas a una granulación. La granulación es el proceso por el cual las partículas primarias se adhieren entre sí para formar partículas de mayor tamaño llamadas gránulos. Estos gránulos pueden ser de distintos tamaños dependiendo el tipo de comprimido que se desee (8).

Luego de la granulación viene la etapa de compresión para formar el núcleo del comprimido. Esta etapa se lleva a cabo con unas máquinas especiales denominadas punzones, los cuales mediante fuerza forman una muestra porosa de tamaño definido. La presión con la que se compactan los comprimidos debe ser adecuada para que el medicamento no se quiebre en la manipulación, pero a la vez no tan elevada de tal forma que pueda disolverse al ser administrado (9).

Finalmente viene la etapa de recubrimiento del núcleo, esta etapa no se realiza a todos los comprimidos ya que el objetivo principal del recubrimiento es darles estabilidad a los componentes del medicamento, por lo que existen APIs y excipientes que no la necesitan. Sin embargo, muchos laboratorios realizan este procedimiento para mejorar estéticamente el producto o enmascarar un mal sabor de algún componente.

Las pruebas de calidad anteriormente mencionadas, se realizan al finalizar cada etapa del proceso o en su defecto sobre el producto terminado. Es aquí en donde la iniciativa PAT toma relevancia en el mejoramiento de los controles de calidad, ya que propugna un control de la calidad continuo, en todas y cada una de las etapas de fabricación del producto, pasando la recepción de las materias primas (ensayo de identidad) y de las diferentes etapas del proceso hasta el producto acabado. En este nuevo enfoque, la calidad del producto final se consigue identificando aquellos parámetros que tienen un mayor impacto en el proceso y utilizando los métodos adecuados para su seguimiento a tiempo real (on-line o in-line) durante todo el proceso. En la aplicación in-line, la interface del analizador está directamente en contacto con el proceso, mientras que cuando la aplicación se lleva a cabo de forma on-line, se necesita recirculación de la muestra para que esta pueda llegar al analizador. En cualquier caso, ambos métodos implican una mejora respecto a los procesos off- y at-line, ya que no requieren la extracción de la muestra y los análisis se pueden llevar a cabo de forma mucho más automatizada y en tiempo real. Por tanto, los esfuerzos se basan en reducir la variabilidad de los procesos

haciendo que la calidad sea consecuencia inherente al proceso productivo, libre de errores sorpresas y productos que no cumplan los requisitos de calidad estipulados (10). Sin embargo, la aplicación de la nueva filosofía de trabajo requiere el desarrollo y la utilización de técnicas analíticas rápidas y sencillas que permitan adquirir de forma rápida la información necesaria. En este contexto, las técnicas espectroscópicas como la espectroscopía Raman y en especial las espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS), han tenido un papel fundamental en el desarrollo de iniciativa PAT debido a su carácter no invasivo y a la posibilidad de realizar un muestreo en cualquier punto de la cadena de producción y la obtención de información relacionada con numerosos atributos de calidad, lo que permite realizar análisis multicomponente a partir de un espectro, analizar muestras sin pretratamiento, monitorizar procesos en línea y además delegar análisis rutinarios a personal no especializado (11,12)

Todo esto ha permitido el éxito de espectroscopía NIR y Raman como material de estudio en el control de los diversos procesos que componen la cadena de producción farmacéutica. En la tabla 1-1 se enumeran algunas aplicaciones de las dos técnicas a las distintas etapas del proceso farmacéutico.

**Tabla 1-1:** Aplicaciones PAT de las espectroscopías NIR y Raman para procesos farmacéuticos.

Ref.	Técnica	Producto	Analito	Proceso	Test
(13)	NIR/Raman	Comprimido	Amlodipino Valsartan	at-line	Uniformidad de contenido
(14)	NIR/Raman	Comprimido	Bisoprolol Hidroclorotiazida	at-line	Uniformidad de contenido
(15)	NIR/Raman	Comprimido	Indometacina	at-line	Uniformidad de contenido
(16)	NIR/Raman	Comprimido	Piracetam	at-line	Uniformidad de contenido
(17)	NIR	Polvo	Naproxeno	on-line	Uniformidad de mezclado
(18)	NIR/Raman	Comprimido	Haloperidol	at-line	Uniformidad de contenido
(19)	NIR	Comprimido	Atorvastatina Amlodipino	at-line	Uniformidad de contenido
(20)	Raman	Comprimido	Atorvastatina	at-line	Uniformidad de contenido
(21)	NIR	Polvo	Atorvastatina Amlodipino	at-line	Uniformidad de mezclado
(22)	NIR	Polvo	Paracetamol	in-line	Uniformidad de mezclado
(23)	Raman	Comprimido	Ambroxol Paracetamol	at-line	Uniformidad de contenido
(24)	NIR/Raman	Comprimido	Cafeína Ácido acetilsalicílico	at-line	Uniformidad de contenido
(25)	NIR	Comprimido	Fosfato de calcio	at-line	Tamaño de partícula
(26)	NIR-CI	Gránulos	Ácido acetilsalicílico	at-line	Compresión
(27)	NIR	Gránulos	Teofilina	in-line	Contenido de humedad
(28)	NIR	Polvo	No informado	on-line	Uniformidad de mezclado

## 1.2 ESPECTROSCOPIA NIR

### 1.2.1 HISTORIA

La radiación del infrarrojo cercano (NIR), comprendida entre los 780 y 2500 nm del espectro electromagnético, fue descubierta en 1800 por astrónomo germano-británico sir William Herschel (15/11/1738-25/10/1822) (29), al descomponer la luz blanca proveniente del sol haciéndola pasar por un prisma observó un aumento de temperatura fuera de la zona espectral correspondiente al espectro visible, lo que indicaba la existencia de una forma de luz invisible más allá del color rojo. Años después, se

demonstraría que la única diferencia entre la luz y la radiación infrarroja es su longitud de onda y ambas serían incluidas en lo que hoy se conoce como espectro electromagnético (Figura 1-2).

La primera documentación espectral NIR se le atribuye a Abney y Festing cuando en 1881 registraron los primeros espectros NIR de líquidos orgánicos en el intervalo espectral de 700 a 1200 nm (30).

La aparición de los primeros espectrofotómetros comerciales a mediados del siglo XX contribuyó notablemente al desarrollo de las primeras aplicaciones analíticas, en donde se destaca el trabajo de Wilbur Kaye en 1954, (31), quien presentó su trabajo en el cual se registraron espectros de diferentes líquidos orgánicos entre 700 y 3500 nm, asignando los grupos funcionales de la molécula a las diferentes bandas.

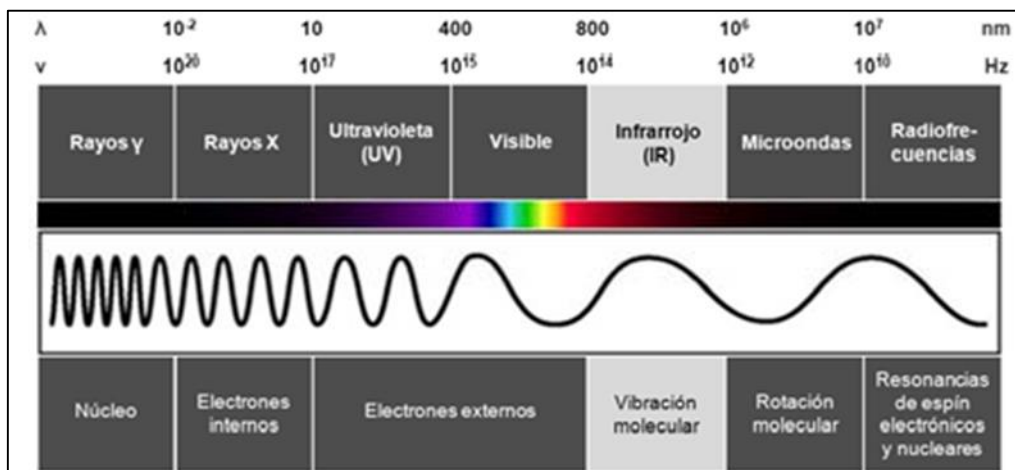
Luego en 1960 los trabajos de Norris y Butler en matrices complejas de origen vegetal, (32) provocaron un aumento en el interés de la técnica que llevaron a la posterior expansión de aplicaciones en el sector industrial.

Al interés generado por la industria se sumaron los avances en el campo de la electrónica y la óptica de la década de los 70s, lo que provocó la aparición de nuevos instrumentos que permitirían el registro de espectros completos, con una mayor rapidez y reproducibilidad (33,34). Otro avance clave en el desarrollo de la técnica fue en el campo de la informática; la posibilidad de usar ordenadores con más y mejor capacidad de cálculo permitió obtener y almacenar una gran cantidad de información espectral, que a

la vez podía ser tratada con las técnicas quimiométricas que permitieron la extracción de información analítica relevante y la extensión del uso de la espectroscopía NIR a problemas más complejos.

En resumen, la evolución informática ocurrida en el último cuarto del siglo XX potenció de manera exponencial el desarrollo de la espectroscopía NIR, y sus aplicaciones en el control de calidad industria, planteando una nueva forma de realizar química analítica de manera no invasiva, en terreno y sin requerimientos de personal especializado.

**Figura 1-2:** Espectro electromagnético, con los fenómenos asociados a cada región. Destacada en gris, la zona del infrarrojo (35).



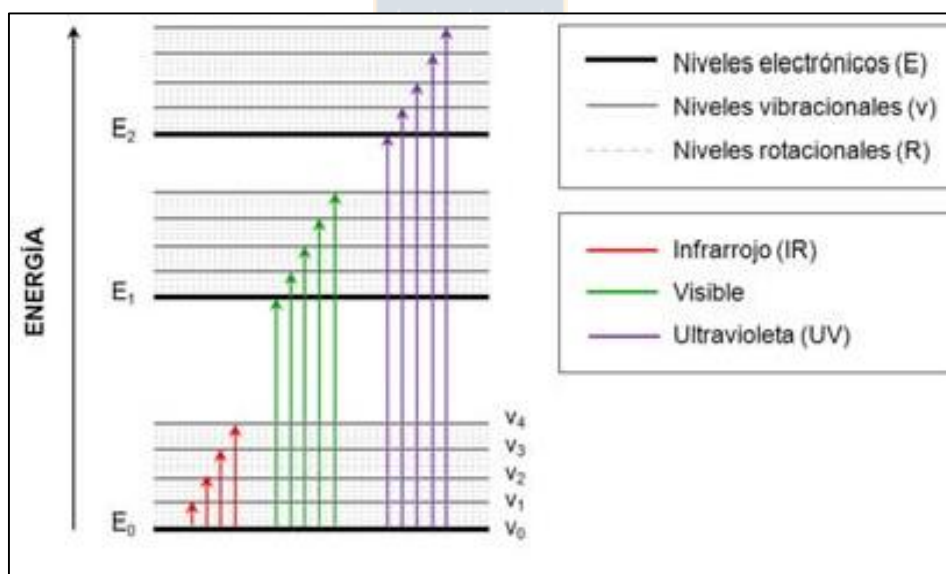


### 1.2.2 FUNDAMENTOS

La región espectral del infrarrojo (IR) es la zona comprendida entre los 780 nm a los  $10^6$  nm o  $12800-10\text{ cm}^{-1}$ , es decir, entre el visible y las microondas en el espectro electromagnético (ver figura 1-2). Según el fenómeno espectroscópico que provoca la absorción de energía por parte de la materia, podemos dividir esta región en tres zonas; Infrarrojo lejano (FIR), comprendida entre  $4 \times 10^4$  y  $10^6$  nm, la absorción está relacionada con fenómenos de rotación molecular; infrarrojo medio (MIR), comprendido entre 2500 y  $4 \times 10^4$  nm la absorción está relacionada con vibraciones moleculares fundamentales ( $\Delta v = \pm 1$ ); infrarrojo cercano (NIR), comprendido entre 780 y 2500 nm la absorción está relacionada con sobretonos y bandas de combinación de las vibraciones moleculares fundamentales del MIR. De esto se deduce que bandas que aparecen en esta zona corresponden principalmente a cambios en los estados vibracionales y rotacionales de la molécula, a diferencia de otras zonas espectrales como el ultravioleta-visible (UV-Vis) o los rayos X, en donde la radiación electromagnética es lo suficientemente energética provocando transiciones electrónica es su estructura. (36). Esto se observa en la figura 1-3 en donde se ilustran las distintas transiciones que pueden producirse por absorción de radiación IR, visible y UV. Una molécula para absorber radiación infrarroja debe experimentar un cambio neto en el momento dipolar como consecuencia de su movimiento de vibración o rotación. Al

ocurrir este cambio, el campo eléctrico asociado a la radiación puede interactuar con el campo eléctrico originado por la fluctuación del momento dipolar de la molécula. La transferencia y posterior absorción de energía ocurre sólo si la frecuencia de radiación iguala a la frecuencia de vibración natural de la molécula. Por el contrario, en las especies homonucleares ( $H_2$ ,  $O_2$ ,  $N_2$ ,...), el momento dipolar no se altera durante la vibración o rotación y, en consecuencia, este tipo de compuestos no absorben en el infrarrojo.

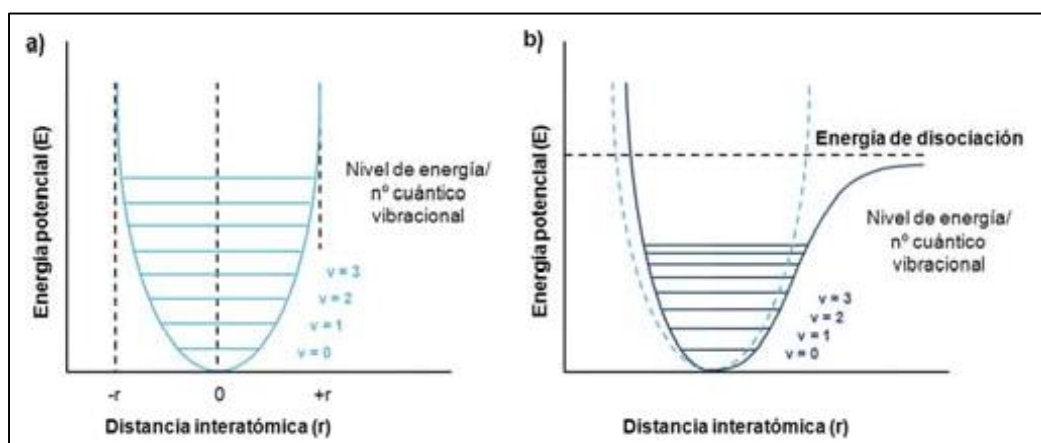
**Figura 1-3.** Diagrama de los niveles de energía de un átomo o molécula. IR (en rojo) sólo se muestran las transiciones puramente vibracionales, entre las que se distinguen (de izquierda a derecha): banda fundamental, 1º, 2º y 3er sobretono. Las bandas rotacionales no se muestran en la figura



Se considera que la vibración de enlaces moleculares diatómicos sigue el modelo del oscilador armónico (ley de Hooke), donde las características de la vibración se aproximan a las que seguirían dos masas unidas por un resorte. Cuando se produce una vibración, la energía potencial cambia continuamente acercándose a cero cuando los átomos se acercan a la posición de equilibrio y haciéndose máxima cuando la distancia entre los átomos es mínima o máxima tal como se muestra en la figura 1-4a. En este modelo, los distintos niveles energéticos son equidistantes y la transición sólo se permite entre niveles de energía vecinos ( $\Delta v = \pm 1$ ). Sin embargo, este modelo de oscilador armónico resulta incompleto para describir moléculas reales, ya que cuando dos átomos se acercan existe una repulsión coulombica entre sus núcleos y en sentido contrario del movimiento, lo que implica un aumento más rápido de la energía potencial. Por otra parte, cuando los átomos se alejan, la distancia interatómica se acerca a la distancia de rotura del enlace, con la consiguiente disminución de energía potencial (37,38). Para acercar el modelo a la realidad se incorpora el modelo de anarmonicidad. Como se observa en la Figura 1-4b, las curvas armónica y anarmónica son muy similares a energías potenciales bajas, por lo que el comportamiento de los enlaces es armónico alrededor de la posición de equilibrio (banda fundamental), pero pierde la simetría al alejarse de esta (36). En el modelo anarmónico las transiciones energéticas permitidas no se observan solamente para la banda fundamental ( $\Delta n = \pm 1$ ) sino que también se observan transiciones  $\Delta n = \pm 2, \pm 3, \dots$ , cuyas

bandas se denominan sobretonos y aparecen a longitudes de onda entre los 780 y los 2000 nm según su orden y la naturaleza del enlace en cuestión (38). Al tratarse de transiciones menos frecuentes que las vibraciones fundamentales del MIR, su intensidad es menor: entre 10-100 veces menor para el primer sobretono, dependiendo del enlace en cuestión (39) y su probabilidad decrece a medida que aumenta el número cuántico vibracional ( $v$ ) (40).

**Figura 1-4.** Diagrama de energía de los modelos vibracionales de las moléculas: (a) modelo del oscilador armónico y (b) modelo del oscilador anarmónico.



En el caso de las moléculas polinucleares pueden producirse bandas de combinación debido a cambios simultáneos en la energía de dos o más modos de vibración, estos adoptan valores equivalentes a combinaciones lineales de las frecuencias de las bandas fundamentales que interaccionan, su intensidad también es baja y suelen aparecer entre los 1900 y los 2500 nm.

### 1.2.3 INSTRUMENTACIÓN

Como se mencionó en el apartado anterior, la aparición de los primeros instrumentos comerciales no sucedió hasta aproximadamente 150 años después del descubrimiento de la radiación a mediados del siglo XX, esto debido a que las bandas de absorción exigen instrumentación con bajo nivel de ruido, gran sensibilidad y estabilidad, especialmente para aplicaciones cuantitativas. El esquema básico de un espectrofotómetro NIR es esencialmente igual que los equipos empleados en otras regiones del espectro electromagnético y consta de: fuente de radiación, selector de longitudes de onda, el compartimento de la muestra y el detector.

#### 1.2.3.1 FUENTE DE RADIACIÓN

La fuente de radiación es un dispositivo capaz de generar el haz de luz necesario para irradiar la muestra, la lámpara de fibra de tungsteno con ventana de cuarzo en la actualidad es la fuente de radiación más utilizada por a su bajo coste, gran robustez, larga duración (unos 12 meses de trabajo continuo) y su emisión es de los 320 a 2500 nm, lo que abarca en su totalidad la región. Otra fuente de radiación son los *Light Emitting Diodes* (LED) atractivos por su pequeño tamaño y su alta eficiencia, pero emiten sólo hasta 1600 nm, lo que supone la pérdida de la mitad del espectro NIR por lo que su uso se limita a moléculas que absorban en ese intervalo espectral determinado (38,40).

### 1.2.3.2 SELECTOR DE LONGITUD DE ONDA

Un buen sistema de selección de onda es fundamental para un correcto funcionamiento del espectrómetro. Para obtener un buen registro espectral, un sistema de selección de longitudes de onda debe ser capaz de proporcionar un ancho de banda preciso y exacto para la longitud de onda analítica, y proporcionar señales altas a fin de conseguir una relación señal/ruido satisfactoria, característica fundamental por la baja absorción de las moléculas.

De acuerdo al dispositivo utilizado para la selección de longitudes de onda, los selectores se pueden clasificar en dispersivos o no dispersivos. En los equipos dispersivos la selección de onda se realiza mediante un conjunto de monocromadores constituidos por colimadores junto a un elemento dispersante, que es la parte fundamental del sistema que permite la descomposición de radiación incidente siendo las más habituales las redes de difracción.

Los equipos no dispersivos son los más ampliamente utilizados y componen un grupo heterogéneo en él se encuentra el *Acousto-Optic Tunable Filters* (AOTF), que selecciona longitudes onda variando el índice de refracción de un cristal birfringente a través de radiofrecuencias y los instrumentos de Transformada de Fourier (FT-NIR), los cuales dividen la luz en dos haces cuyas longitudes de trayectoria se pueden variar periódicamente para dar modelos de interferencia mediante un espejo móvil

obteniéndose un registro denominado interferograma, el cual mediante la transformada de Fourier se convierte en el espectro en dominio de frecuencias.

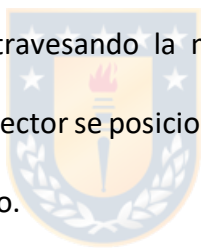
Los únicos equipos que prescinden de selector de longitud de onda son los equipos basados en LEDs como fuente de radiación (41). Dado que los LEDs trabajan en rangos estrechos de longitudes de onda, estos instrumentos no requieren selector de longitudes de onda. Esto implica que no incorporan partes móviles en su mecanismo, por lo que son equipos directos y robustos, muy adecuados para uso en equipos portátiles (38).

### *1.2.3.3 COMPARTIMENTO DE MUESTRA*

La ausencia de pretratamiento de la muestra para el registro del espectro, permite disponer de gran cantidad de accesorios adaptables a cada situación, por lo que el compartimento de muestra que se utilice va a depender de la aplicación para la cual se utilice. La espectroscopía NIR ofrece una gran versatilidad para el análisis de muestras sólidas, líquidas y gaseosas. Además las sondas de fibra óptica permiten *llevar el instrumento a la muestra* en vez *llevar la muestra al instrumento* haciendo la espectroscopía NIR una excelente herramienta para los análisis *on-line* e *in-line*, es decir, no invasivo.

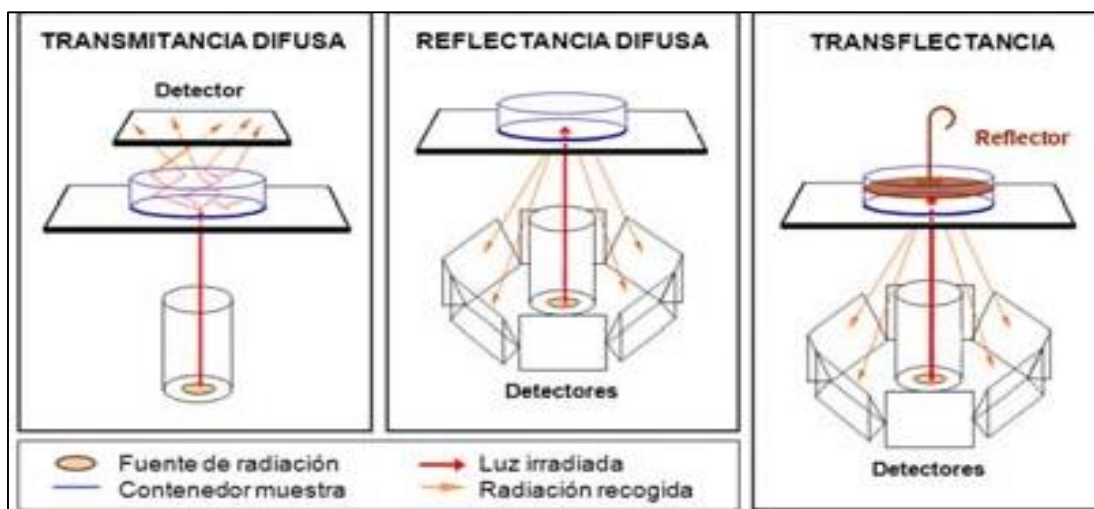
Existen tres modos de registro espectrales NIR, transmitancia, reflectancia y transflectancia. La figura 1-5 muestra los esquemas de los 3 tipos de configuraciones de registro de espectros. En el modo reflectancia, la radiación puede ser especular o difusa.

La reflectancia especular descrita por las leyes de Fresnel no aporta información sobre la composición de la muestra, por lo que solo contribuye al ruido. La reflectancia difusa tiene lugar en todas las direcciones como consecuencia de los procesos de absorción y dispersión. El modo de registro más habitual para muestras sólidas opacas es el de reflectancia difusa. En el modo de registro de transmitancia La absorción de la radiación sigue la ley de Lambert-Beer. La transmitancia de la solución es la fracción de radiación incidente transmitida por la solución, en este caso, la fuente de radiación y el detector se colocan en lados opuestos de la muestra. Así, se utiliza para el análisis de líquidos (42), gases (43) y para el análisis cuantitativo (44). Por último, en el modo transflectancia el haz de radiación incidente entra en contacto con la muestra y la atraviesa, se refleja en el reflector y retorna de nuevo atravesando la muestra, finalmente la radiación es captada por el detector, por lo el reflector se posiciona a un lado de la muestra y la fuente la radiación y el detector al otro lado.





**Figura 1-5:** Esquema de las tres geometrías de iluminación en espectrómetros NIR; reflectancia, transflectancia y transmitancia.



#### 1.2.3.4 DETECTOR

Los detectores más habituales utilizados en Espectroscopía NIR están contruidos con semiconductores como InGaAs, PbS, InAs, InSb, Si, estos son componentes electrónicos de conductancia asimétrica que cuentan con baja resistencia a la corriente en una dirección y alta resistencia en otra. Consisten en una pieza cristalina del metal donde un extremo está cargado negativamente y el otro positivamente (habitualmente a través del dopaje del cristal con metales con diferente número de electrones de valencia). El detector más ampliamente utilizado es el de PbS, que posee sensibilidad adecuada entre 900 y 2600 nm. Para medidas por transmisión en sólidos se utilizan detectores de Arseniuro de Indio y Galio (InGaAs), operativo de 600 a 1900 nm (41).

#### 1.2.4 APLICACIONES

Desde sus primeras aplicaciones en química analítica, la espectroscopía NIR ha despertado un gran interés en el sector industrial. El amplio abanico de muestras que pueden ser analizadas por NIR junto con los avances tecnológicos, ha hecho que el número de aplicaciones NIR en los diferentes campos haya crecido considerablemente en los últimos años.

Las primeras aplicaciones de la espectroscopía NIR fueron en el campo agroalimentario (45,46) y se dirigieron hacia la determinación de la humedad, el contenido en fibras, grasas y proteínas en cereales. La leche y sus productos derivados también han sido objeto de análisis mediante espectroscopía NIR determinándose la proteína, la humedad, la grasa, la lactosa, el lactato y las cenizas (41).

En las refinerías petroleras es cada vez más importante reducir los costes del proceso. Larrechi et al. discuten algunas consideraciones a tener en cuenta en la aplicación de la espectroscopía NIR en la determinación de propiedades de interés en la industria petroquímica (47-49).

Un sector de gran auge en los últimos años es el del medio ambiente. El desarrollo de instrumentos portátiles permite llevar a cabo medidas in-situ. Stallard et al. desarrollaron una metodología mediante espectroscopía NIR para la determinación del grado de contaminación del suelo por aceites de motor (50).

La industria textil también se ha beneficiado de las ventajas de la espectroscopía NIR., presentando una variedad de aplicaciones como son: la identificación de textiles, la determinación de humedad y el control del proceso (51).

Finalmente señalar el incremento de aplicaciones que ha tenido en la industria farmacéutica tanto para análisis cualitativo como cuantitativo, siendo este último el que más protagonismo ha tenido en cuando a publicaciones se trata (tabla 1-1). Se han desarrollado métodos para la determinación cuantitativa de diversos parámetros de importancia en la industria farmacéutica, como son la concentración de principio activo y excipientes en las distintas etapas del producción (52) (materias primas, granulados, núcleos o comprimidos), el tamaño de partícula (53), densidad aparente (54). La bibliografía (55, 56) ofrece varias revisiones exhaustivas acerca de las aplicaciones de la tecnología NIR en el ámbito farmacéutico.



### **1.3 ESPECTROSCOPIA RAMAN**

#### **1.3.1 HISTORIA**

La primera vez que se predijo el fenómeno Raman fue en 1923 por Smekal (57), sin embargo, no fue hasta el año 1928 en donde fue descrito por primera vez a manos del físico indio *Sir* C. V. Raman lo que le valió el premio Nobel de 1930 (58). El fenómeno se descubrió mientras estudiaba la dispersión de la luz en el agua y en alcoholes purificados, fue ahí cuando uno de sus alumnos observó un cambio de color en un rayo de luz solar que no pudo ser eliminado por su equipo, por tanto sospecharon que el fenómeno era

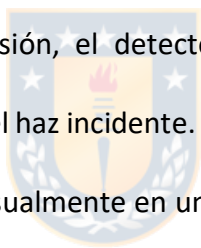
una propiedad característica de la sustancia. Tras realizar diversos estudios durante los cinco años siguientes, Raman y su discípulo Krishnan, publicaron el famoso artículo en la revista Nature en 1928, en el que describieron este nuevo tipo de radiación secundaria. El efecto Raman se basa en la dispersión inelástica de la radiación electromagnética como resultado de un intercambio energético entre radiación y vibración molecular.

### **1.3.2 FUNDAMENTOS**

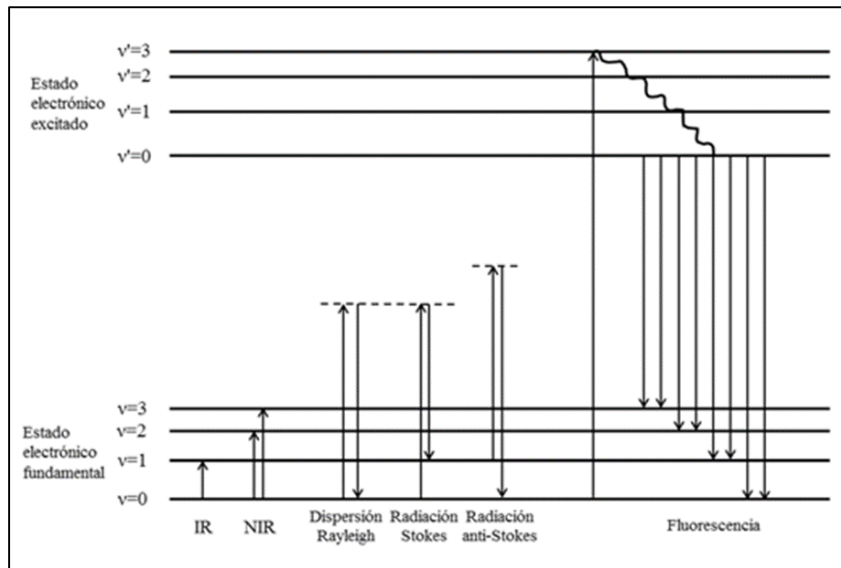
En Espectroscopía Raman, las muestras son iluminadas con una fuente de radiación monocromática, la cual puede pertenecer a la región del visible o del infrarrojo cercano. La energía de esta fuente de radiación es mucho mayor a la necesaria para llevar las moléculas a un estado vibracional excitado, por lo que la mayor parte de la radiación es remitida a la misma longitud de onda, dispersión Rayleigh. Solamente una fracción del orden de  $10^{-8}$  es dispersada inelásticamente por las moléculas de la muestra, indicando un cambio energético ocurrido entre la luz incidente y la muestra. Esta dispersión inelástica se denominó efecto Raman. La figura 1-6 muestra los fenómenos asociados a la interacción de radiación con la materia, las líneas discontinuas muestran estados virtuales para poder distinguirlos de estados excitados reales. Dado el carácter inherentemente débil del efecto Raman, las diferentes transiciones pueden interferir significativamente. Además, el haz láser puede dar lugar a episodios de fotodegradación, calentamiento y ablación de la muestra. El haz incidente puede ser absorbido cuando su longitud de onda corresponda a una banda de absorción en el espectro de la molécula

provocando la transición a un estado electrónico excitado. Además también puede ocurrir la absorción de la radiación previamente dispersada y fenómenos de fluorescencias pueden provocar cambios sustanciales en las señales Raman. La radiación dispersada puede ser de menor frecuencia (radiación Stokes) o de mayor frecuencia (radiación anti-Stokes). A temperatura ambiente hay un mayor porcentaje de moléculas en el estado vibracional fundamental, por lo tanto la radiación Stokes será más intensa que el anti-Stokes. Sin embargo, a temperaturas altas aumenta el porcentaje de moléculas excitadas provocando un fenómeno de radiación anti-Stokes. La mayoría de los equipos comerciales detectan únicamente la radiación Stokes.

La dispersión ocurre en todas las direcciones, pero sólo una fracción es detectada. Así, en el esquema clásico de retrodispersión, el detector sólo recoge la radiación Raman dispersada en la misma dirección del haz incidente. Luego, el espectro Raman se dispone como la diferencia en frecuencia (usualmente en unidades de número de onda) entre el haz incidente y la radiación dispersada frente a la intensidad.



**Figura 1-6:** Diagrama de los fenómenos de Absorción IR y NIR, efecto Raman y fluorescencia.



Para que una molécula sea activa en Raman debe producir un cambio en su polarizabilidad durante un modo normal. Se entiende por polarizabilidad vibracional la capacidad de la nube electrónica de una molécula para distorsionarse en presencia un campo electromagnético. Así, la superposición de vibraciones elementales de enlaces da lugar a las vibraciones moleculares, llamadas modos normales

### 1.3.3 INSTRUMENTACIÓN

Los equipos Raman comerciales consisten en cuatro componentes básicos; una fuente de excitación, normalmente un láser de onda continua; un sistema de iluminación y colección espectral de la muestra; un selector de longitud de onda y un sistemas de detección y procesador de información.

### *1.3.3.1 FUENTES DE EXCITACIÓN*

En la actualidad los láseres son fuentes de excitación ideales para Raman debido a que pueden producir un haz altamente monocromático y de gran potencia (1-2 W para los de onda continua y de 10 a 100 W para pulsados), además el diámetro del haz láser pueden reducirse de los habituales 1-2 mm hasta el rango de los micrómetros usando simples sistemas de lentes.

Como se mencionó, para la selección de la longitud de onda del láser es fundamental conocer las propiedades fisicoquímicas de la muestra a analizar para evitar procesos de degradación o fenómenos de fluorescencia. En la actualidad existe una gran variedad de láseres de onda continua o con pulsadas que permiten excitar a la muestra a distintas longitudes de onda, dependiendo de la molécula a analizar y así reducir los fenómenos de interferencia.

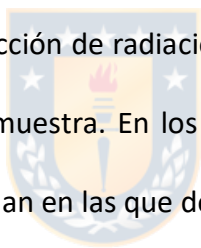


### *1.3.3.2 ILUMINACIÓN DE LA MUESTRA*

Desde un punto de vista práctico, un parámetro determinante en el uso de la espectroscopía Raman es la longitud de onda de la fuente láser de excitación. Los primeros espectrómetros utilizados fueron los dispersivos equipados con láseres de espectro visible, que ofrecen una gran sensibilidad pero también favorecen la aparición de fenómenos de fluorescencia, por lo que el desarrollo de espectrómetros de transformada de Fourier equipados con láser de infrarrojo cercano ha permitido la aplicación de esta técnica a un amplio abanico de tipos de muestras. Además, con el

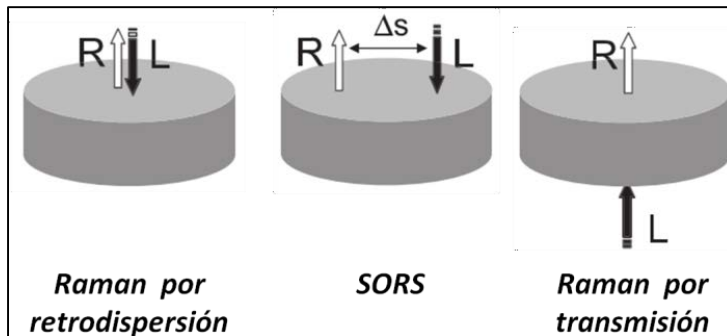
propósito de mejorar la calidad de los espectros se desarrollaron la microscopía confocal Raman y la Espectroscopía Raman de Superficie Aumentada (SERS) (59). La primera permite el análisis en profundidad de sólidos sin necesidad de realizar cortes transversales y alcanza resoluciones espectrales del orden del micrómetro. En esta técnica, el haz láser es enfocado hacia un punto de difracción limitada en la muestra. La radiación Raman dispersada se reenfoca a una pequeña apertura confocal que actúa como filtro espacial, recogiendo la radiación Raman proveniente únicamente del punto muestreado. Por otro lado, en SERS la dispersión Raman proviene de un compuesto adsorbido en un metal estructurado, obteniéndose un aumento en la señal de tres a seis órdenes de magnitud.

La geometría de iluminación y colección de radiación Raman es determinante a la hora de obtener información válida de la muestra. En los últimos años se ha dotado de gran versatilidad a la espectroscopía Raman en las que destacan la espectroscopía Raman por retrodispersión: la espectroscopía Raman espacialmente desplazada o SORS por sus siglas en inglés (*Spatially Offset Raman Spectroscopy*) y la espectroscopía Raman por transmisión. En la figura 1-7 se esquematizan las tres geometrías consideradas.





**Figura 1-7:** Geometrías de iluminación en espectroscopía Raman, donde; R es la señal Raman, L es el haz láser y  $\Delta s$  el desplazamiento espacial.



La retrodispersión es la geometría clásica, donde la fuente de radiación y el colector de la señal se encuentran en el mismo sentido respecto a la muestra. Un inconveniente de esta geometría instrumental es la baja penetración de la radiación láser en la muestra, lo que provoca que la mayoría de la señal Raman provenga de las primeras capas de la muestra disminuyendo la representatividad del muestreo.

Por su parte, la geometría SORS se basa (60) en que la mayoría de los materiales interactúan con la radiación en forma de reflectancia difusa, así el registro de los espectros Raman se realiza en regiones espacialmente desplazadas del punto de incidencia del láser. Esto provoca que la intensidad del haz incidente se vaya distribuyendo aleatoriamente hacia los lados del punto de incidencia a lo largo de todo el espesor de muestra. Por consecuencia el registro contiene una mayor proporción de la señal generada a profundidades mayores y es posible conocer la composición de diferentes capas de la muestra de manera directa.

### *1.3.3.3 SELECTORES DE LONGITUD DE ONDA*

Debido a que la señal Raman es varios órdenes de magnitud menor que la dispersión Rayleigh, es necesaria una separación eficiente de ambas radiaciones. Un filtro ampliamente utilizado es el filtro de interferencia, donde dos superficies ópticamente planas generan una interferencia constructiva y transmiten longitudes de onda del doble del grosor del filtro, sin embargo, su uso queda restringido a espectrómetros Raman con iluminación láser en el espectro visible, ya que su sensibilidad es baja. Por otro lado, la aparición de espectrómetros equipados con interferómetros, cuya sensibilidad es varios órdenes de magnitud mayor que los dispersivos, ha permitido la utilización de iluminación láser en el infrarrojo cercano, que, a pesar de que la señal Raman sea menos intensa, es menos susceptible a fenómenos de fluorescencia que interfieran las señal Raman.



### *1.3.3.4 DETECTORES*

Como se ha venido mencionando a lo largo de este apartado, la señal Raman es inherentemente débil y el detector ha sido el componente instrumental que ha retrasado la aparición de instrumentos comerciales respecto a otras técnicas espectrométricas.

Uno de los primeros detectores utilizados fueron los detectores de Canal único, llamados así porque contienen un único punto sensible a la luz, el registro se realiza de manera secuencial, en donde al ajuste de la rendija le sigue la colección del dato a cada paso del

monocromador.

Existen también los detectores multicanal los cuales cuentan con múltiples elementos de resolución (áreas separadas sensibles a la luz) ordenados en forma matricial. Así, el espectrómetro dispersará diversas longitudes de onda permitiendo su detección simultánea.

Otro tipo de detector son los Fotodiodos en línea (PDA), estos consisten en fotodiodos montados en un soporte de silicio. La radiación incidente crea un par agujero-electrón que descarga un capacitor en cada fotodiodo. La cantidad total de corriente necesaria para recargar el capacitor a su valor nominal determina la cantidad de radiación que ha impactado en el fotodiodo.

También están los detectores de Ge que se utilizan cuando se irradia la muestra con láseres en la región espectral NIR y los detectores de indio, galio y arsénico (InGaAs) que se desarrollaron como mejora respecto a los detectores de Ge. La región espectral sensible se extiende de los 800 a los 1700 nm.

#### **1.3.4 APLICACIONES**

Antes de mediados de los años 1980, las aplicaciones de la espectroscopía Raman estaba limitada por moléculas resistentes a la degradación producida por la excitación de la fuente, sin embargo la evolución tecnológica instrumental hizo posible una ampliación de las aplicaciones especialmente para materiales farmacéuticos. Varios aspectos de la

espectroscopía Raman la hacen muy atractiva para el análisis en estado sólido en la industria farmacéutica. Habitualmente los API contienen anillos aromáticos y estructuras conjugadas que proporcionan intensas señales Raman, a diferencia de los excipientes, que suelen consistir en cadenas alifáticas, por lo que esta técnica puede potencialmente ser superior al NIR para el análisis de APIs a concentraciones bajas. La intensidad de la señal Raman del agua es baja, lo que a diferencia de la espectroscopía NIR, permite el análisis en medios acuosos como el test de disolución. Así, entre sus aplicaciones se encuentran la identificación de materias primas (previa construcción de bibliotecas espectrales) (61), cuantificación de principios activos (62), cribado de polimorfos (63), soporte durante el escalado de procesos químicos (64), y también el análisis de componentes minoritarios en muestras heterogéneas y de su distribución. La revisión exhaustiva de las aplicaciones Raman en el campo farmacéutico se puede encontrar en la bibliografía (65-67).



## **1.4 QUIMIOMETRÍA**

### **1.4.1 ORIGENES DE LA QUIMIOMETRÍA**

La quimiometría nace como una herramienta analítica para la interpretación de datos complejos en donde la información de interés es difícil de observar a simple vista. Recordemos que las técnicas espectrométricas generan una gran cantidad de información relacionada con las muestras analizadas y en muchos casos no directamente

relacionados con los parámetros fisicoquímicos de interés, por lo que la quimiometría ha cumplido un papel fundamental en el éxito del NIR como técnica analítica transformando los datos en información valiosa.

Si bien las raíces de la quimiometría se remontan al año 1969 cuando Kowalski, Jurs y Isenhour publicaron una serie de artículos en donde hablaban de la aplicación de máquinas de aprendizaje lineal para clasificar espectros de masa de baja resolución (68-74), no fue hasta el año 1971 cuando Svante Wold acuña por primera vez el nombre de quimiometría en uno de sus trabajos (75), al mismo tiempo que Kowalski usaba el nombre de “Laboratory of Chemometrics” para su grupo de investigación. Tres años después se formaba la *International Chemometrics Society* (ICS), que describe la quimiometría como “la disciplina que relaciona las medidas realizadas en sistemas o procesos químicos con el estado del sistema mediante la aplicación de métodos matemáticos o estadísticos”. Con el pasar de los años esta definición ha ido cambiando, y actualmente la más popular es la propuesta por Massart *et al.* (76) en la que la define como “la disciplina química que utiliza métodos matemáticos, estadísticos y otros métodos basados en la lógica formal para: (a) diseñar o seleccionar procedimientos de medida y experimentos óptimos; y (b) proporcionar el máximo de información química relevante mediante el análisis de datos químicos”.

La quimiometría puede ser utilizada para diversos objetivos de carácter analítico como lo son el tratamiento de las señales registradas, métodos de reconocimiento de pautas y métodos de calibración para fines cuantitativos univariantes y de variables múltiples. Son muchas las técnicas quimiométricas que se pueden utilizar para llevar a cabo estos objetivos. En este capítulo se describen algunas de ellas, haciendo especial énfasis en aquellas que han sido utilizadas en esta memoria y en las que, aunque no se hayan utilizado, su explicación ayudará a una mejor comprensión de las que sí lo han sido.

#### **1.4.2 MODELOS CUALITATIVOS**

Para llevar a cabo un análisis cualitativo como la o la caracterización de una muestra, se han desarrollado un conjunto de métodos quimiométricos denominados métodos de reconocimiento de pautas (PRM, *Pattern Recognition Methods*) (35). Estos métodos funcionan estableciendo un criterio matemático que permite expresar cuantitativamente la similitud entre una muestra y una referencia o entre una muestra y una clase (52). Los PRM pueden clasificarse en “supervisados” y “no supervisados” dependiendo de si se tiene conocimiento previo o no de las muestras. Los métodos no supervisados suelen utilizarse como un primer análisis exploratorio de muestras cuya clasificación o agrupación es levemente conocida. Por el contrario, los métodos supervisados permiten la construcción de ciertas reglas de clasificación en base a las características observadas en el grupo de calibración y aplicarlas posteriormente a muestras

desconocidas. Una de las grandes aplicaciones de los PRM supervisados es la creación de bibliotecas espectrales para identificación y cualificación de muestras desconocidas a través de comparaciones espectrales (77).

#### 1.5.2.1 ANÁLISIS EN COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)

El análisis en componentes principales (PCA, *Principal Component Analysis*) es una de las técnicas multivariantes más utilizadas en quimiometría con una amplia variedad de artículos en las que se describe (78-81). El PCA es un método de reducción de variables que permite condensar, sin pérdidas relevantes, un gran volumen de información, como por ejemplo, las que proporcionan los datos espectroscópicos.

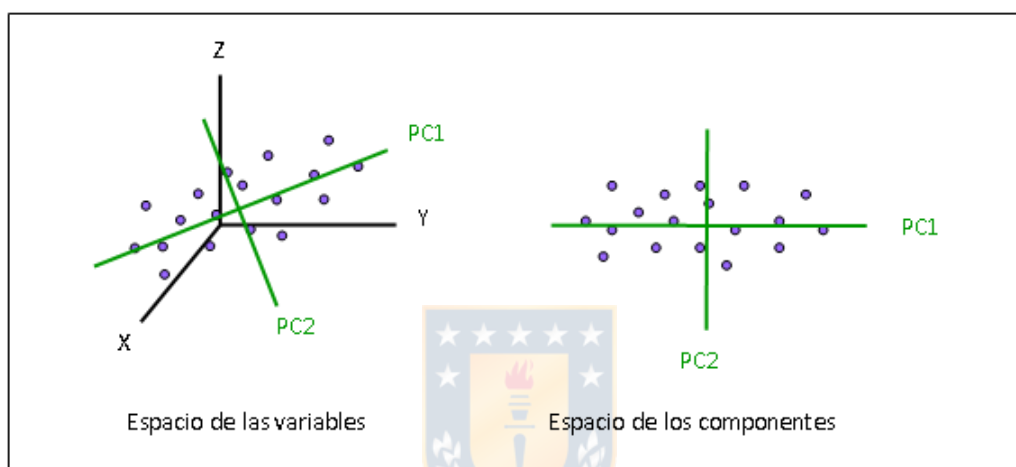
La compresión de los datos se consigue por descomposición matemática de las variables correlacionadas originales (absorbancia a muchas longitudes de onda,  $\mathbf{X}$ ) en un conjunto mucho menor de variables latentes ( $A$ ) no correlacionadas, denominadas componentes principales (PC, *Principal Components*). La matriz de datos espectrales  $\mathbf{X}(M \times N)$  se descompone en sus PCs mediante la Ecuación 1-1:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^t + \mathbf{E} \quad \text{Ecuación 1-1}$$

donde,  $\mathbf{T}(M \times A)$  es la matriz de *scores* de los PCs,  $\mathbf{P}(A \times N)$ , la matriz de *loadings* y  $\mathbf{E}(M \times N)$ , la matriz de residuales del modelo. Los *scores* son los valores numéricos de las nuevas variables  $A$  para cada muestra, mientras que los

*loadings* describen las nuevas variables A en términos de las variables originales. Por su parte, los residuales corresponden a la variabilidad de los datos originales no explicada por el modelo. La figura 1-8 muestra de forma gráfica la reducción de variables realizada por el PCA.

**Figura 1-8.** Representación gráfica de la reducción de la dimensionalidad llevada a cabo por un PCA desde un sistema de 3 variables a uno de 2 componentes principales.



Los PCs son combinaciones lineales de las variables originales, ortogonales entre ellas, que actúan como nuevos ejes de coordenadas del sistema. La ortogonalidad de los PCs es lo que permite eliminar la correlación intrínseca de las variables originales. Otra característica de los PCs es que se escogen en función de la dirección que recoge mayor variabilidad del conjunto de muestras, así el primero recoge la máxima variabilidad del conjunto de muestras, el segundo recoge una variabilidad inferior al primero y es ortogonal a éste y así sucesivamente hasta



que se explica la máxima información relevante. De esta forma, el estudio de las causas de variabilidad de un grupo de muestras es mucho más fácil e intuitivo, ya que los primeros PCs explican los efectos sistemáticos de los datos y, a partir de cierto número de componentes, la varianza se debe principalmente al ruido.

Un aspecto fundamental en un PCA es la elección del número de componentes principales que contienen la información relevante del sistema en estudio. Se han descrito diferentes procedimientos para la estimación del número de componentes principales significativos. El más habitual es representar la varianza explicada (o varianza residual) en función del número de PC's y escoger el número mínimo para el cual no se encuentra mejora significativa. Esta elección puede hacerse por simple visualización del gráfico o estadísticamente aplicando un test F al cociente de las varianzas. En cualquier caso, el número de componentes escogido debe tener sentido químico y debe ser coherente con lo que se observa en el gráfico.

#### *1.5.2.2 COEFICIENTE DE CORRELACIÓN*

El coeficiente de correlación (CC) es un índice estadístico que mide el grado de relación entre dos variables cuantitativas. Se define como la relación entre la covarianza (Cov) y las desviaciones estándar ( $\sigma$ ) de cada una de las variables (Ecuación 1-2) (96). En espectroscopía NIR, el CC se utiliza como medida de similitud

espectral entre una muestra y una referencia. En este caso, su ecuación se puede escribir como se indica en la Ecuación 1-3, donde  $x_j$  e  $y_j$  son los valores de absorbancia a la longitud de onda  $j$  para el espectro de la muestra,  $x = (x_1, \dots, x_j, \dots, x_n)$ , y el espectro de referencia,  $y = (y_1, \dots, y_j, \dots, y_n)$ , respectivamente. El CC puede tomar valores entre  $|0-1|$ , indicando mayor similitud espectral cuanto más cercano al valor uno.

$$CC = \frac{Cov(x,y)}{\sigma_x \sigma_y} \quad \text{Ecuación 1-2}$$

$$CC = \frac{\sum_{j=1}^n (x_j - \bar{x})(y_j - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{j=1}^n (x_j - \bar{x})^2 \sum_{j=1}^n (y_j - \bar{y})^2}} \quad \text{Ecuación 1-3}$$

El CC es esencialmente un parámetro cualitativo utilizado como criterio discriminante en bibliotecas espectrales con fines identificativos (97,98). En este caso, se construyen clases con los espectros seleccionados. Para determinar si una muestra problema pertenece a una clase concreta, se calcula el CC entre el espectro de la muestra y el centro de calibración de la clase y se compara el resultado obtenido con el límite de discriminación establecido previamente.

### 1.5.2.3 ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTOS

Los análisis de agrupamientos son técnicas de análisis de datos no supervisados cuya finalidad es descubrir los agrupamientos naturales existentes en un conjunto de datos experimentales

en función de la disimilaridad de sus componentes (99). La disimilaridad es una cantidad,  $d(i,j)$  que mide lo distintas que son las filas de una matriz  $Z$  asociando cada par de objetos contenido en la matriz, dando como resultado una matriz cuadrada y simétrica.

Las medidas de disimilaridad se realizan mediante el cálculo de distancias entre los objetos o variables. Existen diferentes expresiones matemáticas para calcular estas distancias, las cuales se explicaran a continuación:

- Distancia Euclidiana: es la más difundida de las distancias y está definida mediante la siguiente ecuación:

$$d(z_i, z_j) = \sqrt{(z_{i1} - z_{j1})^2 + \dots + (z_{in} - z_{jn})^2} \quad \text{Ecuación 1-4}$$

- Distancia de Manhattan: La distancia de Manhattan entre 2 vectores  $p$  y  $q$  en un espacio vectorial real  $n$ -dimensional con un sistema de coordenadas cartesianas fijo, es la suma de las longitudes de las proyecciones del segmento de línea entre los puntos sobre el sistema de ejes. Más formalmente,

$$d_1(p, q) = |p - q|_1 = \sum_{i=1}^n |p_i - q_i| \quad \text{Ecuación 1-5}$$

- Distancia de Mahalanobis: la distancia de Mahalanobis entre 2 variables aleatorias con la misma distribución de probabilidad se define mediante la siguiente ecuación:

$$d_1(p, q) = \sqrt{(p - q)^T S^{-1} (p - q)} \quad \text{Ecuación 1-6}$$

donde  $p = (p_1, p_2, \dots, p_n)$  y  $q = (q_1, q_2, \dots, q_n)$  son vectores y  $S$  es la matriz de covarianza.

La distancia de Mahalanobis se diferencia de la distancia Euclidiana en que tiene en cuenta la correlación entre las variables aleatorias mediante la matriz de covarianza

### 1.4.3 MODELOS CUANTITATIVOS

Todo modelo de calibración permite establecer la relación entre la respuesta instrumental y la propiedad a determinar sobre un conjunto de muestras representativas. Como se ha mencionado, la espectroscopía NIR proporciona un gran número de variables respuesta para cada muestra, y estas variables por lo general no pueden ser asignadas a un solo analito dificultando su análisis. Esto ha propiciado el desarrollo de métodos de calibración conocidos como Métodos de Calibración Multivariantes (100-102). Dentro de los modelos de calibración más utilizados en espectroscopía NIR podemos encontrar.

#### 1.5.3.1 REGRESIÓN EN COMPONENTES PRINCIPALES (PCR)

El PCR es un método cuantitativo en el cual incorporara previamente una reducción de variables mediante un PCA (Ecuación 1-1) para luego relacionar la concentración de las muestras con las absorbancias a cada longitud de onda. Una vez elegido el número de componentes principales que se considere como óptimo para describir la matriz X, ésta se puede representar por su matriz de scores T y loadings P:

$$T = XP$$

Ecuación 1-7

A continuación, la matriz de datos Y se puede calcular según la expresión:

$$Y = TB + E \quad \text{Ecuación 1-8}$$

siendo B la matriz de los coeficientes de regresión que se halla por mínimos cuadrados conociendo los valores de Y del conjunto de calibración:

$$\hat{B} = (T^T T)^{-1} T^T Y \quad \text{Ecuación 1-9}$$

El símbolo ^ indica valores calculados de los coeficientes de regresión, los cuales son utilizados para predecir un conjunto de nuevas muestras mediante la matriz de los scores de las muestras de predicción T\* a través de la siguiente ecuación:

$$Y = T^* \hat{B} \quad \text{Ecuación 1-10}$$

Uno de los principales problemas con PCR es que los componentes principales que mejor representan la matriz de los datos espectroscópicos X, pueden no ser los más apropiados para la predicción de las propiedades de los analitos que queremos determinar (103).

#### 1.5.3.2 REGRESIÓN POR MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLS).

El método de regresión PLS (Partial Least Squares) se basa también en una reducción de variables, sin embargo, a diferencia del PCR, la descomposición de la matriz espectral se realiza simultáneamente con la matriz de la propiedad a determinar descomponiéndose también según la Ecuación 1-1 modificada a:

$$Y = UQ^T + F \quad \text{Ecuación 1-11}$$

donde  $Y$  es la matriz de la propiedad a determinar,  $U$  es la matriz de scores,  $Q^T$  es la matriz de loadings transpuesta y  $F$  la matriz de residuales.

En este caso, la descomposición de ambas matrices no es independiente, sino que se realiza de forma simultánea, estableciéndose una relación interna entre los scores de los bloques  $X$  e  $Y$  (ecuación 1-11):

$$\hat{U} = bT \quad \text{Ecuación 1-12}$$

donde  $b$  es el coeficiente de regresión para cada uno de los factores del modelo.

El cálculo del valor  $Y$  de una muestra desconocida se realiza utilizando la relación interna:

$$Y = T^* \hat{B} Q^T + F \quad \text{Ecuación 1-13}$$

donde  $T^*$  es la matriz de *scores* de la muestra analizada obtenida del modelo calculado,  $\hat{B}$  es el coeficiente de regresión de cada factor,  $Q^T$  la matriz de *loadings* del modelo y  $F$  el residual de la predicción.

En el caso de calcular una sola propiedad a determinar de la matriz  $Y$  el algoritmo recibe el nombre de PLS1 y se puede considerar una simplificación del algoritmo global conocido como PLS2, en el cual se realiza la determinación simultánea de  $n$  variables.

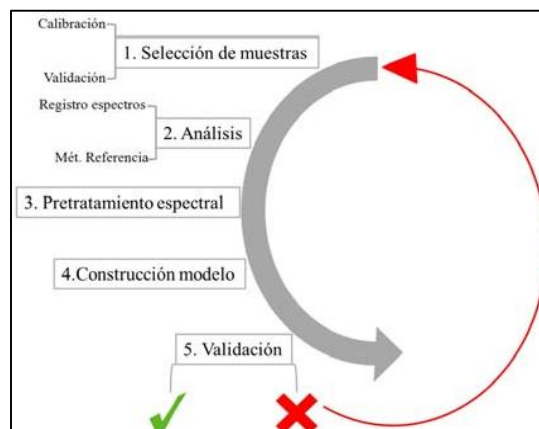
Una de las ventajas del método PLS es que permite resolver algunos de los problemas

típicos de los datos espectroscópicos como la colinealidad, que se elimina en la reducción de variables, o el ruido, que al concentrarse en componentes PLS elevados se puede eludir fácilmente (104). Además, al incluir la varianza de Y en el modelado, se reduce el impacto de grandes variaciones en los datos espectroscópicos irrelevantes para el modelo (105).

#### 1.4.4 ETAPAS DE MODELADO

El principal objetivo de los métodos multivariantes es compensar la complejidad de los espectros NIR y analizar la gran cantidad de información que contienen, tanto cualitativa como cuantitativamente. Pero el proceso de modelado de los datos precisa de una serie de etapas básicas que van desde el diseño y preparación de muestras hasta la aplicación del modelo de calibración desarrollado (106). Por ello, en este apartado se presentan las etapas generales de un proceso de modelado de datos espectroscópicos esquematizados en la Figura 1-9.

**Figura 1-9:** Esquema general del proceso de modelado para técnicas espectroscópicas multivariantes.



#### ***1.5.4.1 SELECCIÓN DE MUESTRAS DE CALIBRACIÓN***

El conjunto de calibración debe contener las fuentes de variabilidad esperadas para las muestras para las que se prepara el método. En el caso de la industria farmacéutica ejemplos de dichas fuentes pueden ser diferentes lotes de fabricación, proveedores de materias primas o tamaño de partícula de alguno de los componentes (107).

Blanco et al. (108) plantean las diferentes estrategias que se han usado en el campo farmacéutico para construir un conjunto de calibración que incorpore la variabilidad del proceso productivo y el rango de concentraciones de la propiedad a determinar.

- **Muestras preparadas en planta piloto**, simulando los procesos de producción industriales reales (109,110) o siguiendo los mismos pasos en el laboratorio (111). Este método es laborioso y requiere de equipamiento específico, pero permite desarrollo de muestras altamente representativas.
- **Muestras dopadas**, que se consiguen añadiendo a las muestras de producción ciertas cantidades de alguno de los componentes de la mezcla para conseguir el rango deseado de concentraciones (112). Las cantidades añadidas deben ser pequeñas para que las características físicas de la muestra no varíen significativamente.
- **Muestras sintéticas de laboratorio**, preparadas por pesada, a las cuales suelen añadirse cierto número de muestras de producción para incorporar la variabilidad física del proceso de producción a los espectros de las muestras sintéticas de laboratorio (113)



#### ***1.5.4.2 MÉTODO DE REFERENCIA***

El análisis de las muestras mediante un método de referencia permite medir el parámetro de interés de una manera precisa y exacta. Al realizar la calibración usando estos valores como verdaderos, la precisión y exactitud del método multivariante dependerán de la precisión y exactitud del método de referencia.

#### ***1.5.4.3 OBTENCIÓN DE LA SEÑAL ANALÍTICA***

En esta etapa ocurre el registro de señales de las muestras mediante la técnica escogida y su posterior análisis. Es importante señalar que es siempre necesario realizar una inspección visual de los espectros para detectar posibles errores. Un buen modelo de calibración requiere tanto de unos valores fiables de método de referencia como unos espectros representativos y reproducibles.

#### ***1.5.4.4 PRETRATAMIENTO ESPECTRAL***

En la mayoría de los análisis espectroscópicos es necesario aplicar un pretratamiento espectral que permita aumentar la relación señal/ruido y acrecentar la señal del analito de interés. No todos los pretratamientos consiguen ambos objetivos simultáneamente, por lo que la selección del más apropiado es puramente experimental, siendo los pretratamientos espectrales más utilizados:

- Promedio de espectros: Es un pretratamiento simple basado en el promediado de espectros (o por filas) de una misma muestra, de forma que la señal del analito no se

ve afectada, pero el ruido aleatorio se reduce en un factor igual a la raíz cuadrada del número de espectros promediados. Este pretratamiento se aplica rutinariamente en la mayoría de equipos comerciales, ya que permite suavizar el ruido instrumental

- Centrado de los datos: Es una técnica que consiste en sustraer a cada espectro individual el espectro medio del conjunto de datos. Para ello, se resta la media de cada variable ( $\bar{x}_j$ ) al valor de absorbancia correspondiente de cada fila ( $x_{i,j}$ ). El valor medio corresponde al centro del modelo, y los valores de todas las variables se encuentran ahora referidos a este centro.
- Suavizado: Los métodos de suavizado se utilizan para reducir matemáticamente el ruido aleatorio e incrementar la relación señal/ruido. Todos ellos se basan en el uso de una ventana móvil, de un número fijo de puntos ( $n+1$ ), que debe ser impar y  $\geq 3$  (35). El caso más común es el **suavizado de Savitzky- Golay** (114) que utiliza cálculos polinómicos de convolución para asignar los pesos a cada punto de la ventana.
- Variable Normal Estándar: El pretratamiento de la variable normal estándar (SNV, *Standard Normal Variate*) es uno de los pretratamientos más utilizados para la eliminación del *scattering*, dada su simplicidad y efectividad en la corrección de variaciones espectrales debidas a efectos multiplicativos (93).

Matemáticamente, el SNV equivale a un autoescalado por filas, ya que opera individualmente sobre cada espectro, centrándolo a una intensidad media de valor cero y desviación estándar igual a uno.

- Derivadas: Las derivadas son uno de los pretratamientos más utilizados porque permiten reducir algunos de los problemas característicos de la espectroscopía NIR y en algunos casos de la espectroscopía Raman. La primera derivada permite eliminar los términos constantes como es el desplazamiento de línea base y la segunda permite eliminar los términos que varían linealmente con la longitud de onda. Los algoritmos más habituales son el *Moving Average Segment Convolution* y por Savitzky y Golay (114).
- Normalización: Aunque existen distintos tipos de normalización (sobre el área, entre el máximo y el mínimo del espectro) el más habitual en espectroscopía Raman es la normalización a vector unidad, ya que una de las principales fuentes de variabilidad en espectroscopía Raman es la intensidad del láser. Mediante este pretratamiento se favorece la reducción en la variabilidad de la intensidad de la fuente de radiación.



#### ***1.5.4.5 CONSTRUCCIÓN DEL MODELO***

Una vez pretratados los espectros, se escoge una herramienta quimiométrica acorde al objetivo de trabajo que permita establecer la relación más simple entre la señal analítica y el parámetro objetivo, evitando caer en el sobreajuste, es decir, cuando el modelo es representativo del conjunto de muestras de calibración pero no de las de validación. Para ellos se evalúan distintos parámetros implicados, como lo son el pretratamiento, el intervalo espectral, el umbral de identificación, número de factores, errores de calibración, entre otros.

Los mismos métodos utilizados para NIR convencional son aplicados a datos hiperespectrales NIR-CI previamente desdoblados. En este caso, tanto los métodos cualitativos como los cuantitativos suelen conocerse en imagen química como métodos de clasificación, ya que permiten identificar regiones con características espectrales similares, dando información sobre la distribución y concentración de propiedades físicas y químicas de la muestra a lo largo de su superficie (115,116).

#### ***1.5.4.6 VALIDACIÓN DEL MODELO***

La evaluación del modelo se lleva a cabo mediante la aplicación de éste a un conjunto de muestras conocidas (para modelos cualitativos se conoce su identidad y para cuantitativos se conoce el valor de la propiedad a determinar). Este nuevo conjunto de muestras debe ser independiente al anterior. Si los resultados de predicción no son satisfactorios, el modelo debe ser recalculado (117). La bibliografía muestra algunas tendencias utilizadas para escoger una estrategia y así decidir la validez el método.

- **Parámetros estadísticos descriptivos:** Esta ha sido la estrategia de decisión clásica y la que rige en las guías oficiales de validación. La guía ICH para validación de métodos analíticos (1) exige para la validación de la linealidad, el coeficiente de correlación, la pendiente y la suma de cuadrados residuales. Además, requiere otros parámetros estadísticos descriptivos para validar la precisión (repetitividad, precisión intermedia y reproducibilidad), la especificidad y la exactitud entre otras.

De esta manera, no existe un único parámetro que permita decidir la adecuación de un método a su fin, si no que se utilizan conjuntamente múltiples parámetros estadísticos descriptivos, que pueden llegar a llevar a conclusiones contradictorias. Un parámetro analítico de gran relevancia en los modelos multivariantes, es la evaluación del error de predicción, a través de los siguientes parámetros estadísticos:

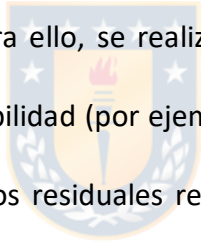
- a. Error estándar de predicción (SEP): Este parámetro calcula la desviación media de los valores de predicción respecto a los de referencia y además tiene en cuenta el sesgo en el cálculo.
- b. Error cuadrático medio de predicción (RMSEP): este parámetro sólo difiere del SEP en que no tiene en cuenta el sesgo para calcular el error
- c. Error estándar relativo de predicción (RSEP): este parámetro divide la desviación de cada valor predicho entre el valor de referencia obteniéndose el error en forma porcentual

A pesar de ello, se ha de tener en cuenta estos parámetros se utilizan en combinación con otros (como son el coeficiente de correlación, sesgo o los distintos parámetros de medida de error de calibración; SEC, RSEC, RMSEC, parámetros análogos a los anteriormente descritos).

- El uso de test de hipótesis para comprobar si las diferencias obtenidas entre los

valores de referencia y los predichos por la técnica espectroscópica son significativas. Así, cuando el test de hipótesis no es significativo se entiende como la ausencia de diferencias entre valores de referencia y predicción. De todas maneras, el punto débil de este criterio es que la ausencia de una prueba de un efecto no es la prueba de la ausencia de éste. Este enfoque se utiliza generalmente para evaluar si la diferencia media entre los resultados de dos métodos (por ejemplo multivariante vs. de referencia) es significativa (por ejemplo, mediante un test t pareado para evaluar el sesgo del método).

- Un tercer enfoque (118) se basa en la capacidad predictiva del método en las condiciones de rutina reales, utilizando una estrategia estadística llamada intervalos de tolerancia. Para ello, se realizan experimentos de validación con diferentes fuentes de variabilidad (por ejemplo, días u operadores) y se calcula una distribución normal de los residuales respecto a los valores conocidos y se compara con el valor umbral preestablecido. Así, la exactitud y la precisión se evalúan conjuntamente expresados como error total.



## 1.5 ENFOQUE DE ESTUDIO

Como se ha venido mencionando a lo largo de este capítulo, la inclusión de las técnicas espectroscópicas y quimiométricas en el sector industrial, especialmente en el farmacéutico, ha traído consigo una serie de beneficios tanto en la calidad de los productos como en la productividad de ellos. Sin embargo, la instauración de la espectroscopía como técnica analítica de primera elección en los laboratorios de producción no ha evolucionado transversalmente en relación a su instauración en la academia. La fuerte inversión inicial que involucra la implementación de la iniciativa PAT y de las técnicas espectroscópicas, junto con la inseguridad de la aceptación de los nuevos métodos por parte de las autoridades regulatorias, son las principales razones por las cuales la espectroscopía NIR ha sido esquiva en el sector industrial. Estos argumentos van de la mano, y pueden ser revertidos en la medida que se genere una asociación entre el sector industrial y el académico que incluya una retroalimentación robusta extrapolable a las agencias reguladoras.

En este contexto, si nos enfocamos la región, Sudamérica es la zona geográfica que presenta las menores tasas de aplicabilidad en el mercado de las técnicas espectroscópicas (124), en donde su uso se enfoca al sector minero, ambiental, agrícola, minero y bromatológico. Esto hace de Chile, y sus países vecinos, un terreno fértil para generar este nexo académico-industrial y ampliar el dominio de aplicaciones NIR como lo ha sido en la industria europea y norteamericana. Para ello, es imprescindible mantener

activo el interés mediante estudios que respalden la importancia de innovar en tecnología farmacéutica, y desarrollar metodologías de trabajo accesibles a la industria que faciliten el análisis e interpretación de los resultados por parte del personal de laboratorio, y así, salir del estancamiento histórico en el que se encuentra este sector industrial farmacéutico a nivel local.

El enfoque de esta tesis es continuar con la línea de innovación en el análisis de productos farmacéuticos utilizando técnicas espectroscópicas y metodologías de trabajo rápidas y sencillas para los controles de calidad relevantes en la producción de formas farmacéuticas sólidas. En la siguiente sección se describe el marco teórico específico correspondiente a los análisis de calidad estudiados en esta tesis.

- **Cuantificación de principios activos**

Como se mencionó en el apartado 1.1, dentro de los análisis que generan mayor demanda de tiempo y reactivos podemos encontrar la prueba de ***Uniformidad de Dosis***. Esta prueba mide el grado de uniformidad en el contenido del fármaco entre formas farmacéuticas que contienen una única dosis, o parte de una dosis de un fármaco, dentro de un mismo lote. Dependiendo la concentración del API, este ensayo puede realizarse mediante la prueba de uniformidad de contenido, en donde se cuantifica el API por medio de una metodología validada (generalmente cromatográfica), o mediante la valoración de peso.

Para la cuantificación de APIs mediante técnicas analíticas instrumentales, la ICH y las



farmacopeas, establecen una serie de parámetros a evaluar sobre la metodología desarrollada, y así garantizar la validez de los resultados en orden de los requerimientos establecidos por las entidades reguladoras. La validación de métodos cuantitativos requiere la evaluación de ciertos parámetros como la robustez, especificidad, exactitud, linealidad y precisión (repetitividad y precisión intermedia). En el capítulo correspondiente a la metodología de trabajo, se detallarán los lineamientos seguidos para desarrollo y validación de las metodologías utilizadas para el análisis cuantitativo del producto comercial estudiado.

- **Homogeneidad de mezclado**

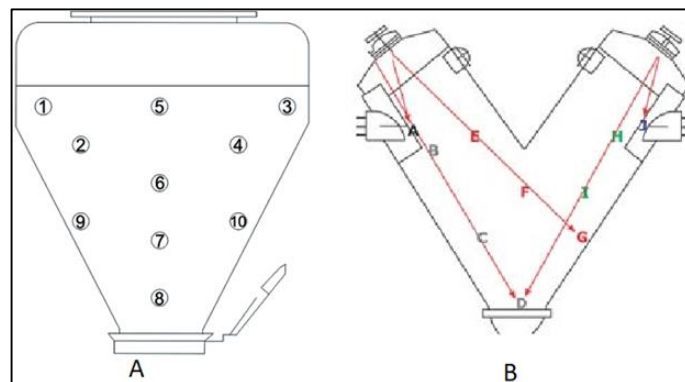
En la fabricación del producto farmacéutico hay una etapa que es considerada como crítica para lograr un producto final de calidad. La determinación del tiempo final de mezclado es sin duda la etapa más importante en la fabricación de formas farmacéuticas sólidas. (119). Un correcto proceso mezclado garantizará una correcta dosificación de los ingredientes activos en cada tableta del lote (test de uniformidad de dosis), requerimiento necesario para cualquier tableta. De ahí radica el creciente interés en estudiar este proceso por diversos grupos de investigación en la última década.

Una mezcla se considera homogénea cuando cada constituyente de esta tiene la misma concentración en todo su contenido. Para demostrar este mezclado homogéneo, la farmacopea establece que se deben identificar al menos diez lugares críticos dentro del mezclador (zonas de dificultad de mezclado) en donde se extraerá parte de la mezcla en

polvo para el posterior análisis cuantitativo de los APIs, esto involucra, en términos de PAT, un proceso farmacéutico off-line o, en el mejor de los casos, at line. La figura 1-10 muestra las zonas del mezclador en las que se lleva a cabo la extracción de la muestra a analizar.

Esta forma muestreo segregado es denominado “sampling thief” por la industria farmacéutica, y ha sido ampliamente criticado en los últimos años por el error analítico que conlleva la extracción de la muestra a analizar (120)

**Figura 1-10:** Esquema del muestreo segregado según el tipo de mezclador utilizado por la industria farmacéutica para evaluar la homogeneidad del mezclado.



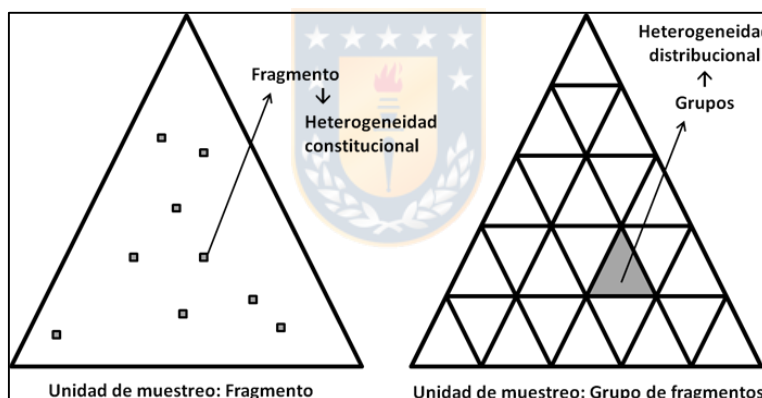
Para entender el origen de las críticas al muestreo segregado, debemos adentrarnos en el reino de la **teoría del muestreo**. Una mezcla homogénea líquida, por ejemplo, si es sometida a una agitación, presenta la misma concentración de sus componentes en todos sus puntos sin ninguna consideración especial. En cambio, el concepto de homogeneidad de una mezcla de sólidos resulta mucho más complejo y exige ciertas consideraciones. La teoría del muestreo, o TOF (theory of sampling) nace como una línea de investigación

que pretende demostrar estadísticamente a representatividad en el que se registran las señales analíticas de una determinada muestra. Es necesario recalcar que la TOS considera al muestreo como al acto de extraer una señal analítica desde un determinado material, ampliando el concepto de sólo extraer una determinada porción de muestra. En este contexto, se afirma que todo material es naturalmente heterogéneo si se analiza desde el punto de vista de sus constituyentes o los elementos básicos de la mezcla que permanecen indivisibles durante el proceso de selección. La TOS llama a estos elementos “fragmentos”, y pueden ser granos, partículas, moléculas o iones, según el caso y la escala en que se haga el registro (en nuestro caso, partículas de API irradiadas). Cada uno de estos fragmentos genera un tipo de heterogeneidad mínima propia del material y que es ajena a cualquier proceso de mezclado, denominada **heterogeneidad constitucional**. Como consecuencia de esta heterogeneidad intrínseca del material, se puede introducir un primer error en el proceso de muestreo denominado error fundamental de muestreo (FSE por sus siglas en inglés) (120) generado en cada registro espectral (muestreo de varios fragmentos). Así mismo, según la terminología de la Teoría de Muestreo, cuando el registro se realiza sobre un conjunto de fragmentos (como es el caso de las técnicas espectroscópicas) la unidad mínima del muestreo se denomina “incremento”. Para una mayor representatividad, el muestreo debe emplearse en función de varios incrementos del lote. No obstante, así como el conjunto de fragmentos dan origen a la heterogeneidad constitucional, el conjunto de incrementos (necesarios para una correcta

representatividad) dan origen a la **heterogeneidad distribucional**. La heterogeneidad distribucional está sumamente ligada a la heterogeneidad constitucional, y por definición, toma en cuenta la heterogeneidad espacial entre todos los incrementos que conforman la totalidad de la mezcla a analizar. Este aspecto de la heterogeneidad de la mezcla está determinado por componentes que van desde la gravedad, hasta cualquier otro agente o fuerza que intervenga.

La figura 1-12 explica de forma esquemática los conceptos de heterogeneidad constitucional y heterogeneidad distribucional para una misma muestra

**Figura 1-11:** Explicación de los conceptos de heterogeneidad constitucional y heterogeneidad distribucional para una misma muestra, considerando su observación en distintas escalas.

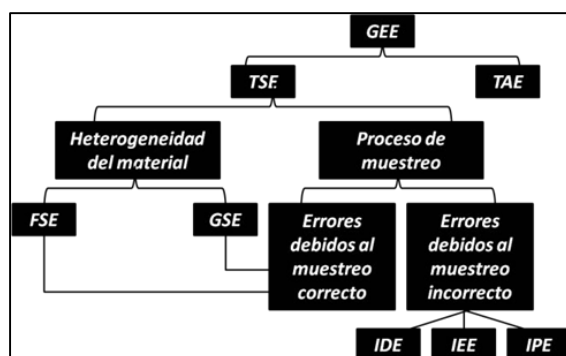


La heterogeneidad distribucional es la causante de la mayor parte de los errores que incluye el proceso de muestreo. Al realizar un aumento de incrementos sobre una muestra, automáticamente se incluye otro error inalterable por el analista denominado error por agrupamiento y segregación (GSE por sus siglas en inglés) (121). Tanto el FSE como el GSE son errores inmodificables por lo que en su conjunto se denominan error

correcto de muestreo (CSE por sus siglas en ingles). Por lo que el CSE es la suma del FSE y el GSE. Por otra parte, cuando el proceso de muestreo incluye la extracción de parte de la muestra total (como por ejemplo el muestreo segregado), además del CSE se incorporan 3 errores que son complementarios entre ellos, los cuales en conjunto se conocen como errores incorrectos de muestreo (ISE por sus siglas en inglés) (122). El error de delimitación del incremento (IDE) y el error de la extracción del incremento (IEE) son los errores asociados a la forma incorrecta de definir volumen que delimita el incremento. Mientras que el error de preparación del incremento (IPE), se presenta si la muestra es alterada luego de su extracción.

Luego la suma de los errores correctos e incorrectos de muestreo (CSE+ISE) dan origen al error total de muestreo (TSE), el cual es un valor estadístico fundamental para evaluar la representatividad y el correcto análisis en los muestreos para mezclados farmacéuticos. La figura 1-12 esquematiza los errores involucrados en el muestreo para análisis de una mezcla de componentes sólidos.

**Figura 1-12:** Interrelaciones entre los 5 errores básicos de muestreo originados en parte por la heterogeneidad del material que constituye una mezcla.



El actual enfoque que engloban los estudios realizados al proceso de mezclado van encaminados a disminuir los errores incorrectos de muestreo (idealmente a cero), es decir, TSE este determinado solo por el CSE. En este contexto, se han desarrollado un conjunto de estrategias tecnológicas que permiten adaptar espectrofotómetros en el sector productivo reduciendo considerablemente el error de muestreo en comparación a la metodología estándar utilizada para la mayoría de los laboratorios farmacéuticos (125-127). En el siguiente capítulo se detalla la estrategia utilizada en este trabajo para determinar el tiempo óptimo de mezclado disminuyendo el error total de muestreo, y así generar un primer acercamiento de la industria farmacéutica nacional a la iniciativa PAT.



## 1.6 REFERENCIAS

- 1) ICH, I. (2005, November). Q2 (R1): Validation of analytical procedures: text and methodology. In *International Conference on Harmonization, Geneva*.
- 2) Food and Drug Administration, HHS. (2009). *International Conference on Harmonisation; guidance on Q8 (R1) Pharmaceutical Development; addition of annex; availability. Notice. Federal register, 74(109), 27325*.
- 3) Zheng, J. (Ed.). (2009). *Formulation and analytical development for low-dose oral drug products*. John Wiley & Sons.
- 4) Mattes, R., Root, D., Zhou, Y., Xiao, C., Johnson, J., & Shukla, A. (2009). *Nir prediction of solid dosage form dissolution profiles. NIR news, 20(5), 10-11*.
- 5) Watts, C. (2004, December). *PAT–A framework for Innovative Pharmaceutical Development Manufacturing and Quality Assurance. In FDA/RPSGB Guidance Workshop*.
- 6) Food and Drug Administration. (2004). *Pharmaceutical current good manufacturing practices (cGMPs) for the 21st century—a risk based approach*.
- 7) Bergum, J. S., Prescott, J. K., Tejwani, R. W., Garcia, T. P., Clark, J., & Brown, W. (2014). *Current events in blend and content uniformity. Pharm Eng, 34(2), 1-10*.
- 8) Aulton, M. E. (2004). *Farmacia: La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas (No. RS420 P48 2004)*.
- 9) Espinoza, C., & Ivan, L. (2015). *Validación concurrente del proceso de recubrimiento de miodel relax® tabletas recubiertas*.
- 10) Pomerantsev, A. L., & Rodionova, O. Y. (2012). *Process analytical technology: a critical view of the chemometricians. Journal of Chemometrics, 26(6), 299-310*.

- 11) Kemper, M. S., & Luchetta, L. M. (2003). A guide to raw material analysis using near infrared spectroscopy. *Journal of near infrared spectroscopy*, 11(3), 155-174.
- 12) Ginot, Y. M., Bernard-Moulin, P., Cinier, R., Despagne, F., Dubost, J. P., Françès, & Monteillet, G. (2010). Quantitative analysis using near infrared spectroscopy, Application to tablet content uniformity, I. Methodology. *STP Pharma Pratiques*, 20(2), 117-135.
- 13) Casian, T., Reznek, A., Vonica-Gligor, A. L., Van Renterghem, J., De Beer, T., & Tomuță, I. (2017). Development, validation and comparison of near infrared and Raman spectroscopic methods for fast characterization of tablets with amlodipine and valsartan. *Talanta*, 167, 333-343.
- 14) Hertrampf, A., Sousa, R. M., Menezes, J. C., & Herdling, T. (2016). Semi-quantitative prediction of a multiple API solid dosage form with a combination of vibrational spectroscopy methods. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 124, 246-253.
- 15) Heinz, A., Savolainen, M., Rades, T., & Strachan, C. J. (2007). Quantifying ternary mixtures of different solid-state forms of indomethacin by Raman and near-infrared spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(3), 182-192.
- 16) Hennigan, M. C., & Ryder, A. G. (2013). Quantitative polymorph contaminant analysis in tablets using Raman and near infra-red spectroscopies. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 72, 163-171.
- 17) Bakri, B., Weimer, M., Hauck, G., & Reich, G. (2015). Assessment of powder blend uniformity: Comparison of real-time NIR blend monitoring with stratified sampling in combination with HPLC and at-line NIR Chemical Imaging. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 97, 78-89.
- 18) Edinger, M., Bar-Shalom, D., Rantanen, J., & Genina, N. (2017). Visualization and non-



*destructive quantification of inkjet-printed pharmaceuticals on different substrates using Raman spectroscopy and Raman chemical imaging. Pharmaceutical research, 34(5), 1023-1036.*

19) Rezneak, A., Gligor, F., Tomuță, I., Vonica-Gligor, A. L., & Casian, T. (2015). *Direct And Simultaneous Quantification Of Atorvastatin And Amlodipine In Tablets By Nir Spectroscopy. Studia Universitatis Babes-Bolyai, Chemia, 60.*

20) Mazurek, S., & Szostak, R. (2009). *Quantification of atorvastatin calcium in tablets by FT-Raman spectroscopy. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 49(1), 168-172.*

21) Vonica-Gligor, A. L., Casian, T., Rezneak, A. N. D. R. A., Tomuta, I., & Gligor, F. (2015). *Simultaneous quantification of atorvastatin and amlodipine in powder blends for tableting by NIR spectroscopy and chemometry. Farmacia, 63, 381-387.*

22) Singh, R., Román-Ospino, A. D., Romañach, R. J., Ierapetritou, M., & Ramachandran, R. (2015). *Real time monitoring of powder blend bulk density for coupled feed-forward/feed-back control of a continuous direct compaction tablet manufacturing process. International journal of pharmaceuticals, 495(1), 612-625.*

23) Szostak, R., & Mazurek, S. (2004). *FT-Raman quantitative determination of ambroxol in tablets. Journal of molecular structure, 704(1-3), 229-233.*

24) Pino-Torres, C., MasPOCH, S., Castillo-Felices, R., Pérez-Rivera, M., Aranda-Bustos, M., & Peña-Farfal, C. (2020). *Evaluation of NIR and Raman spectroscopies for the quality analytical control of a solid pharmaceutical formulation with three active ingredients. Microchemical Journal, 154, 104576.*

25) Ely, D. R., Thommes, M., & Carvajal, M. T. (2008). *Analysis of the effects of particle size and densification on NIR spectra. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,*

331(1-2), 63-67.

26) Khorasani, M., Amigo, J. M., Bertelsen, P., Sun, C. C., & Rantanen, J. (2016). Process optimization of dry granulation based tableting line: extracting physical material characteristics from granules, ribbons and tablets using near-IR (NIR) spectroscopic measurement. *Powder Technology*, 300, 120-125.

27) Fonteyne, M., Arruabarrena, J., de Beer, J., Hellings, M., Van Den Kerkhof, T., Burggraeve, A. & De Beer, T. (2014). NIR spectroscopic method for the in-line moisture assessment during drying in a six-segmented fluid bed dryer of a continuous tablet production line: validation of quantifying abilities and uncertainty assessment. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 100, 21-27.

28) Puchert, T., Holzhauser, C. V., Menezes, J. C., Lochmann, D., & Reich, G. (2011). A new PAT/QbD approach for the determination of blend homogeneity: combination of on-line NIRS analysis with PC Scores Distance Analysis (PC-SDA). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(1), 173-182.

29) Herschel, W. (1832, December). Investigation of the powers of the prismatic colours to heat and illuminate objects; with remarks, that prove the different refrangibility of radiant heat. To which is added, an inquiry into the method of viewing the sun advantageously, with telescopes of large apertures and high magnifying powers. In *Abstracts of the Papers Printed in the Philosophical Transactions of the Royal Society of London (No. 1, pp. 20-21)*. London: The Royal Society.

30) Abney, W. D. W., & Festing, L. C. (1881). XX, On the influence of the atomic grouping in the molecules of organic bodies on their absorption in the infra-red region of the spectrum. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, (172), 887-918.

- 31) Kaye, W. (1954). *Near-infrared spectroscopy: I. Spectral identification and analytical applications*. *Spectrochimica Acta*, 6(4), 257-E2.
- 32) Norris, K. H., & Butler, W. L. (1961). *Techniques for obtaining absorption spectra on intact biological samples*. *IRE transactions on bio-medical electronics*, 8(3), 153-157.
- 33) Noble, D. (1995). *Illuminating near-IR*. *Analytical Chemistry*, 67(23), 735A-740A.
- 34) Henry, C. M. (1999). *Product Review: Near-IR gets the job done*. *Analytical chemistry*, 71(17), 625A-628A.
- 35) Andrés, S. M. (2012). *El procesado de la señal espectroscópica*. In *Técnicas espectroscópicas en química analítica* (pp. 103-152). Síntesis.
- 36) Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. (2001) *Principios de análisis instrumental*, 5ª ed. McGraw-Hill, Madrid.
- 37) Siesler, H. W. (2007). *Basic principles of near-infrared spectroscopy*. In *Handbook of near-infrared analysis* (pp. 25-38). CRC press.
- 38) Blanco, M., & Villarroya, I. N. I. R. (2002). *NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(4), 240-250.
- 39) Ravn, C. (2009). *Near-infrared chemical imaging in formulation development of solid dosage forms*. *Det Farmaceutiske Fakultet*.
- 40) Reich, G. (2005). *Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications*. *Advanced drug delivery reviews*, 57(8), 1109-1143.
- 41) Burns, D. A., & Ciurczak, E. W. (2008). *Commercial NIR instrumentation*. *Handbook of Near-Infrared Analysis (3rd Edition)*. Burns DA, Ciurczak EW (Eds). CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 189-205.

- 42) Broad NW, Jee RD, Moffat AC, Eaves MJ, Mann WC, Dziki W. Non-invasive determination of ethanol, propylene glycol and water in a multi-component pharmaceutical oral liquid by direct measurement through amber plastic bottles using Fourier transform near-infrared spectroscopy. *Analyst*. 2000;125(11):2054-8.
- 43) Werle P, Slemr F, Maurer K, Kormann R, Mücke R, Jänker B. Near-and mid-infrared laser-optical sensors for gas analysis. *Optics and Lasers in Engineering*. 2002;37(2):101-14.
- 44) Drennen JK, Lodder RA. Nondestructive near-infrared analysis of intact tablets for determination of degradation products. *J Pharm Sci*. 1990;79(7):622-7.
- 45) BEN-GERA, I. T. A. M. A. R., & NORRIS, K. H. (1968). Direct spectrophotometric determination of fat and moisture in meat products. *Journal of Food Science*, 33(1), 64-67.
- 46) BIRTH, G. S., & Norris, K. H. (1958). An instrument using light transmittance for nondestructive measurement of fruit maturity. *Food Technology*, 12(11), 592-595.
- 47) Macho, S., & Larrechi, M. S. (2002). Near-infrared spectroscopy and multivariate calibration for the quantitative determination of certain properties in the petrochemical industry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(12), 799-806.
- 48) Blanco, M., MasPOCH, S., Villarroya, I., Peralta, X., Gonzalez, J. M., & Torres, J. (2001). Geographical origin classification of petroleum crudes from near-infrared spectra of bitumens. *Applied Spectroscopy*, 55(7), 834-839.
- 49) Blanco, M., MasPOCH, S., Villarroya, I., Peralta, X., Gonzalez, J. M., & Torres, J. (2001). Determination of physico-chemical parameters for bitumens using near infrared spectroscopy. *Analytica chimica acta*, 434(1), 133-141.
- 50) Stallard, B. R., Garcia, M. J., & Kaushik, S. (1996). Near-IR reflectance spectroscopy for the

determination of motor oil contamination in sandy loam. *Applied Spectroscopy*, 50(3), 334-338.

51) Cleve, E., Bach, E., & Schollmeyer, E. (2000). Using chemometric methods and NIR spectrophotometry in the textile industry. *Analytica Chimica Acta*, 420(2), 163-167.

52) Blanco M, Coello J, Eustaquio A, Iturriaga H, MasPOCH S. Analytical control of pharmaceutical production steps by near infrared reflectance spectroscopy. *Anal Chim Acta*. 1999;392(2):237-46.

53) Ilari J, Martens H, Isaksson T. Determination of particle size in powders by scatter correction in diffuse near-infrared reflectance. *Applied spectroscopy*. 1988;42(5):722-8.

54) Otsuka M. Comparative particle size determination of phenacetin bulk powder by using Kubelka– Munk theory and principal component regression analysis based on near-infrared spectroscopy. *Powder technology*. 2004;141(3):244-50.

55) Roggo, Y., Chalus, P., Maurer, L., Lema-Martinez, C., Edmond, A., & Jent, N. (2007). A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 44(3), 683-700.

56) Jamrógiewicz, M. (2012). Application of the near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical technology. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 66, 1-10.

57) Raman, C. V., & Krishnan, K. S. (1928). A new type of secondary radiation. *Nature*, 121(3048), 501-502.

58) Van Vleck, J. H. (1929). On the vibrational selection principles in the raman effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 15(9), 754.

59) Lewis, I. R., & Edwards, H. (2001). *Handbook of Raman spectroscopy: from the research laboratory to the process line*. CRC press.

60) Matousek, P., Clark, I. P., Draper, E. R. C., Morris, M. D., Goodship, A. E., Overall, N., & Parker, A.

W. (2005). *Subsurface probing in diffusely scattering media using spatially offset Raman spectroscopy*. *Applied spectroscopy*, 59(4), 393-400.

61) McCreery RL, Horn AJ, Spencer J, Jefferson E. *Noninvasive identification of materials inside USP vials with Raman spectroscopy and a Raman spectral library*. *J Pharm Sci*. 1998;87(1):1-8.

62) Strachan CJ, Rades T, Gordon KC, Rantanen J. *Raman spectroscopy for quantitative analysis of pharmaceutical solids*. *J Pharm Pharmacol*. 2007;59(2):179-92.

63) Langkilde, F. W., Sjöblom, J., Tekenbergs-Hjelte, L., & Mrak, J. (1997). *Quantitative FT-Raman analysis of two crystal forms of a pharmaceutical compound*. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 15(6), 687-696.

64) El Hagrasy, A. S., Chang, S. Y., Desai, D., & Kiang, S. (2006). *Raman spectroscopy for the determination of coating uniformity of tablets: assessment of product quality and coating pan mixing efficiency during scale-up*. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 1(1), 37-42.

65) D Patel B, J Mehta P. *An overview: application of Raman spectroscopy in pharmaceutical field*. *Current Pharmaceutical Analysis*. 2010;6(2):131-41.

66) Michelet A, Boiret M, Lemhachheche F, Malec L, Tfayli A, Ziemons E. *Use of Raman spectrometry in the pharmaceutical field*. *STP Pharma Pratiques*. 2013;23(2).

67) Shin, K., & Chung, H. (2013). *Wide area coverage Raman spectroscopy for reliable quantitative analysis and its applications*. *Analyst*, 138(12), 3335-3346.

68) Jurs, P. C., Kowalski, B. R., & Isenhour, T. L. (1969). *Computerized learning machines applied to chemical problems. Molecular formula determination from low resolution mass spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 41(1), 21-27.

69) Kowalski, B. R., Jurs, P. C., Isenhour, T. L., & Reilley, C. N. (1969). *Computerized learning machines*

*applied to chemical problems. Interpretation of infrared spectrometry data. Analytical Chemistry, 41(14), 1945-1949.*

70) Jurs, P. C., Kowalski, B. R., Isenhour, T. L., & Reilley, C. N. (1970). *Computerized learning machines applied to chemical problems. Molecular structure parameters from low resolution mass spectrometry. Analytical Chemistry, 42(12), 1387-1394.*

71) Jurs, P. C., Kowalski, B. R., Isenhour, T. L., & Reilley, C. N. (1969, January). *Computerized Learning Machines Applied to Chemical Problems-on Pattern Classification in Analytical Data Treatment. In ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (No. APR, p. AN23). 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036: AMER CHEMICAL SOC.*

72) Jurs, P. C., Kowalski, B. R., & Isenhour, T. L. (1969). *Computerized learning machines applied to chemical problems. Molecular formula determination from low resolution mass spectrometry. Analytical Chemistry, 41(1), 21-27.*

73) Kowalski, B. R., Jurs, P. C., Isenhour, T. L., & Reilley, C. N. (1969). *Computerized learning machines applied to chemical problems. Multicategory pattern classification by least squares. Analytical Chemistry, 41(6), 695-700.*

74) Jurs, P. C., Kowalski, B. R., & Isenhour, T. L. (1969). *Computerized learning machines applied to chemical problems. Molecular formula determination from low resolution mass spectrometry. Analytical Chemistry, 41(1), 21-27.*

75) Wold, S. (1972). *Spline functions, a new tool in data-analysis. Kemisk Tidskrift, 84(3), 34.*

76) Massart, D. L. (1988). *Chemometrics: a textbook. Data handling in science and technology, 2, 53.*

77) Blanco, M., & Romero, M. A. (2001). *Near-infrared libraries in the pharmaceutical industry: a*

solution for identity confirmation. *Analyst*, 126(12), 2212-2217.

78) Brereton, R. G. (2007). *Applied chemometrics for scientists*. John Wiley & Sons.

79) Miller, C. E. (2010). *Chemometrics in process analytical chemistry*. *Process analytical technology*, 226-324. Bakeev, K.A. (ed.) *Process analytical Technology*. 2<sup>a</sup> ed.; Wiley, Chichester, pp. 353–438

80) Romía, M. B., & Bernàrdez, M. A. (2009). *Multivariate calibration for quantitative analysis*. In *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control* (pp. 51-82)..

81) Eriksson, L., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N., Trygg, J., Wikström, C., & Wold, S. (2006). *Multi- and megavariate data analysis* (Vol. 1, p. 1). Sweden: Umetrics.

82) Asuero, A. G., Sayago, A., & Gonzalez, A. G. (2006). *The correlation coefficient: An overview*. *Critical reviews in analytical chemistry*, 36(1), 41-59.

83) Yoon, W. L., Jee, R. D., Moffat, A. C., Blackler, P. D., Yeung, K., & Lee, D. C. (1999). *Construction and transferability of a spectral library for the identification of common solvents by near-infrared transfectance spectroscopy*. *Analyst*, 124(8), 1197-1203.

84) Blanco, M., Eustaquio, A., Gonzalez, J. M., & Serrano, D. (2000). *Identification and quantitation assays for intact tablets of two related pharmaceutical preparations by reflectance near-infrared spectroscopy: validation of the procedure*. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 22(1), 139-148.

85) Blanco, M., & Cerdà, V. (Eds.). (2007). *Temas avanzados de Quimiometría* (Vol. 125). Universitat Illes Balears.

86) De Juan, A., & Tauler, R. (2006). *Multivariate curve resolution (MCR) from 2000: progress in concepts and applications*. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 36(3-4), 163-176.

87) Puchert, T., Lochmann, D., Menezes, J. C., & Reich, G. (2010). *Near-infrared chemical imaging*



(NIR-CI) for counterfeit drug identification—a four-stage concept with a novel approach of data processing (Linear Image Signature). *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 51(1), 138-145.

88) Patel, A. D., Luner, P. E., & Kemper, M. S. (2000). Quantitative analysis of polymorphs in binary and multi-component powder mixtures by near-infrared reflectance spectroscopy. *International journal of pharmaceuticals*, 206(1-2), 63-74.

89) Ballabio, D., & Todeschini, R. (2009). Multivariate classification for qualitative analysis. *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control*, 83, e102.

90) Wold, S., Eriksson, L., Trygg, J., & Kettaneh, N. (2004). The PLS method—partial least squares projections to latent structures—and its applications in industrial RDP (research, development, and production). Unea University.

91) Blanco, M., Alcalá, M. (2009) Multivariate calibration for quantitative analysis. En: Sun, D.W. (ed.), *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control*. Academic Press, Elsevier, New York, NY, pp. 51-82.

92) Romía, M. B., & Bernárdez, M. A. (2010). NIR spectroscopy in pharmaceutical analysis: Off-line and at-line PAT applications. In *Process Analytical Technology* (pp. 463-492). John Wiley & Sons Ltd., Chichester, United Kingdom.

93) Zamora, D., Blanco, M., Bautista, M., Mulero, R., & Mir, M. (2012). An analytical method for lubricant quality control by NIR spectroscopy. *Talanta*, 89, 478-483.

94) Blanco, M., & Alcalá, M. (2005). Use of near-infrared spectroscopy for off-line measurements in the pharmaceutical industry. *Analytical Technology*, 362.

95) Eustaquio, A., Graham, P., Jee, R.D., Moffatt, A.C., Trafford, A.D. (1998) Quantification of

*paracetamol in intact tablets using near-infrared transmittance spectroscopy. Analyst 123, 2303-2306.*

96) Broad, N.W., Jee, R.D., Moffat, A.C., Smith, M.R. (2001) *Application of transmission near-infrared spectroscopy to uniformity of content testing of intact steroid tablets. Analyst 126, 2207-2211.*

97) Blanco, M., Bautista, M., Alcalá, M. (2008) *Preparing calibration sets for use in pharmaceutical analysis by NIR spectroscopy. J. Pharm. Sci-US 97, 1236-1245.*

98) Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., MasPOCH, S., de la Pezuela, C. (1997) *Strategies for constructing the calibration set in the determination of active principles in pharmaceuticals by near infrared diffuse reflectance spectrometry. Analyst 122, 761-765.*

99) Blanco, M., & Peguero, A. (2010). *Analysis of pharmaceuticals by NIR spectroscopy without a reference method. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 29(10), 1127-1136.*

100) Savitzky, A., & Golay, M. J. (1964). *Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. Analytical chemistry, 36(8), 1627-1639.*

101) Lewis, E. N., Schoppelrei, J. W., Makein, L., Kidder, L. H., & Lee, E. (2010). *Near-Infrared Chemical Imaging for Product and Process Understanding. Process Analytical Technology: Spectroscopic Tools and Implementation Strategies for the Chemical and Pharmaceutical Industries, 245-279.*

102) Gowen, A. A., O'donnell, C. P., Cullen, P. J., & Bell, S. E. J. (2008). *Recent applications of chemical imaging to pharmaceutical process monitoring and quality control. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 69(1), 10-22.*

103) Beebe, K. R., Pell, R. J., & Seasholtz, M. B. (1998). *Chemometrics: a practical guide (Vol. 4).*

Wiley-Interscience.

104) Tomuta, I., Iovanov, R., Vonica, A. L., & Leucuta, S. E. (2011). High-throughput NIR-chemometric method for meloxicam assay from powder blends for tableting. *Scientia pharmaceutica*, 79(4), 885-898.

105) Venables, H. J., & Wells, J. I. (2001). Powder mixing. *Drug development and industrial pharmacy*, 27(7), 599-612.

106) Esbensen, K. H., Román-Ospino, A. D., Sanchez, A., & Romañach, R. J. (2016). Adequacy and verifiability of pharmaceutical mixtures and dose units by variographic analysis (Theory of Sampling)—A call for a regulatory paradigm shift. *International journal of pharmaceutics*, 499(1-2), 156-174.

107) Petersen, L., Minkkinen, P., & Esbensen, K. H. (2005). Representative sampling for reliable data analysis: theory of sampling. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 77(1-2), 261-277.

108) Esbensen, K. H., & Paasch-Mortensen, P. (2010). Process sampling: theory of sampling—the missing link in process analytical technologies (PAT). *Process analytical technology*, 37-80.

109) Khorasani, M., Amigo, J. M., Sun, C. C., Bertelsen, P., & Rantanen, J. (2015). Near-infrared chemical imaging (NIR-CI) as a process monitoring solution for a production line of roll compaction and tableting. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 93, 293-302.

110) Market Research Report. (2017). Process Spectroscopy Market: Maharashtra, India.: Fortune business insights. Recuperado de <https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/process-spectroscopy-market-100391>.

111) Esbensen, K. H., Romañach, R. J., & Román-Ospino, A. D. (2018). Theory of Sampling (TOS): A Necessary and Sufficient Guarantee for Reliable Multivariate Data Analysis in Pharmaceutical

*Manufacturing. In Multivariate Analysis in the Pharmaceutical Industry (pp. 53-91). Academic Press.*

112) Sánchez-Paternina, A., Sierra-Vega, N. O., Cárdenas, V., Méndez, R., Esbensen, K. H., & Romañach, R. J. (2019). Variographic analysis: A new methodology for quality assurance of pharmaceutical blending processes. *Computers & Chemical Engineering, 124*, 109-123.

113) Petersen, L., & Esbensen, K. H. (2005). Representative process sampling for reliable data analysis—a tutorial. *Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society, 19*(11-12), 625-647.



## Capítulo II

# 2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS



## 2.1. HIPOTESIS

Considerando el marco teórico descrito en el capítulo I, esta tesis busca proponer soluciones a problemáticas reales en la industria farmacéutica relacionadas con el control de calidad de sus productos, planteándose la siguiente hipótesis de trabajo.

*“Es posible desarrollar metodologías analíticas rápidas, sencillas y económicas mediante el uso de técnicas espectroscópicas como alternativa a los métodos convencionales utilizados en los controles de formas farmacéuticas solidas, y que además permitan crear una base tecnológica moderna para la implementación del análisis en línea en la industria farmacéutica chilena”*



## **2.2. OBJETIVOS**

### **2.2.1. OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar estrategias analíticas basadas en técnicas espectroscópicas y análisis multivariante que permitan estudiar *at-line* u *on-line* los controles de procesos críticos en la producción de medicamentos en formas farmacéuticas sólidas.

### **2.2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Desarrollar y evaluar nuevas estrategias de análisis para la monitorización *at-line* de un proceso de mezclado farmacéutico mediante espectroscopía NIR y Vis-NIR.
- Desarrollar estrategias de análisis para la monitorización *on-line* de un proceso de mezclado farmacéutico mediante espectroscopía Vis-NIR.
- Desarrollar y evaluar estrategias quimiométricas que permitan realizar el ensayo de uniformidad de dosis en comprimidos farmacéuticos terminado mediante espectroscopía NIR y Raman.



## Capítulo III

# 3. ESTRATEGIA ANALÍTICA DESARROLLADA





Como se mencionó en el capítulo 1, la introducción de la iniciativa PAT por la FDA en 2004 implicó un cambio radical y fundamental en la forma de realizar estudios y controles de calidad en la industria farmacéutica. El desarrollo de estrategias analíticas rápidas, económicas, fáciles de operar y que cumplan con parámetros analíticos que den sustentabilidad a los resultados, es fundamental para la implementación de la iniciativa PAT en la industria farmacéutica.

En este capítulo se describen las distintas estrategias utilizadas para estudiar las etapas críticas del proceso farmacéutico en la formulación del producto comercial.

### **3.1. INSTRUMENTACIÓN ESPECTROSCÓPICA Y EQUIPOS FARMACÉUTICOS**

El monitoreo del proceso de mezclado se realizó por medio de dos espectrofotómetros; para los estudios cuantitativos se utilizó un espectrofotómetro BRUKER MPA de Transformada de Fourier con esfera integradora y con un módulo controlado a través del software OPUS 6.5. El registro de los espectros de las muestras se realizaron en modo reflectancia entre  $12500\text{-}3750\text{ cm}^{-1}$  ( $800\text{-}2666\text{ nm}$ ), con una resolución espectral máxima de  $2\text{ cm}^{-1}$  y una exactitud de  $0.3\text{ nm}$ ; cada espectro es el promedio de 32 barridos.

Para análisis cualitativo se utilizó un espectrofotómetro portátil Vis-NIR Ocean Optics USB 4000 ( $380\text{-}1100\text{ nm}$ ) con un detector Toshiba TCD1304AP con un software OceanView para registrar los espectros mediante una computadora portátil.

El proceso de mezclado se realizó mediante una mezcladora difusiva ERWEKA AR 400 equipada con un recipiente cúbico de 5 litros hecho de polimetilmetacrilato (PMMA) lo que permite un registro espectral en línea para estudios continuos.

La cuantificación de los principios activos para el análisis de uniformidad de dosis en comprimidos terminados se realizó mediante espectroscopía NIR y Raman. Los registros NIR se llevaron a cabo mediante un espectrómetro FOSS 5000 (equipado con el módulo

Rapid Content Analyzer) en modo reflectancia. Cada espectro obtuvo a través del promedio de 32 scans en el intervalo espectral 1100-2498 nm con una resolución de 2 nm. Cada espectro se adquirió a través del software Vision 2.5.1 (Foss NIRSystems, Silver Spring, MD, EE. UU.).

Los espectros Raman se registraron con un espectrómetro Bruker Multi Raman (Bruker, Billerica, MA, EE. UU) utilizando un láser Nd: YAG como fuente de excitación (1064 nm, tamaño de punto 500  $\mu\text{m}$ ) y un detector de diodo Ge refrigerado por  $\text{N}^2$  líquido. Cada espectro se adquirió a través de OPUS 7.2 (Bruker, Billerica, MA, EE. UU.) El compartimento de muestra contiene una estación xyz que permite mover el haz láser en un rango de 10 mm en los tres ejes. El diámetro del área iluminada por el láser es 100  $\mu\text{m}$  pudiéndose usar una opción de desenfoque aumentándolo hasta 500  $\mu\text{m}$ . Las condiciones de trabajo finales fueron una potencia láser de 800 mW, 32 escaneos promediados y una resolución espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$  en el rango de 3600-50  $\text{cm}^{-1}$ .

### **3.2. MÉTODOS DE REFERENCIA**

Tanto el monitoreo del proceso de mezclado como el estudio de uniformidad de dosis se analizaron mediante la metodología de referencia indicada por la USP para estos fines, la cual contempla el análisis mediante técnicas cromatográficas validadas.

Para el proceso de mezclado, el análisis cromatográfico se efectuó mediante un HPLC Shimadzu Prominence (HPLC Modular) acoplado a un detector uv/vis modelo SPD-20A con una bomba modelo LC-AT y una columna RP-18 LiChroCART 125-4 (125 mm x 4 mm LiChrospher 100 tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ ).

La cuantificación de comprimidos terminados se llevó a cabo mediante un HPLC Agilent

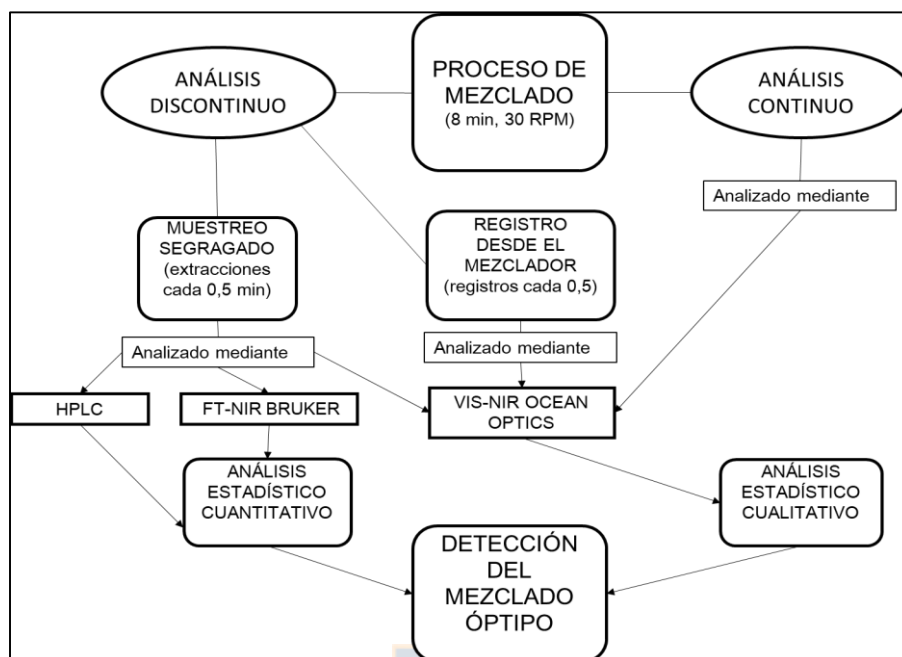
1100 (Santa Clara, CA, EE. UU.) Equipado con una columna C18 (250 mm × 4,6 mm, columna Symmetry-Shield RP18, tamaño de partícula de 5 µm) y se acopló a un detector DAD G1315B.

### 3.3. METODOLOGIA DE ANÁLISIS

Para dar solución a las problemáticas actuales que arrastran la mayoría de los laboratorios farmacéuticos en Chile debido a subdesarrollo en tecnología farmacéutica, a continuación se plantean directrices adoptadas en esta tesis para efectuar los distintos estudios propuestos.

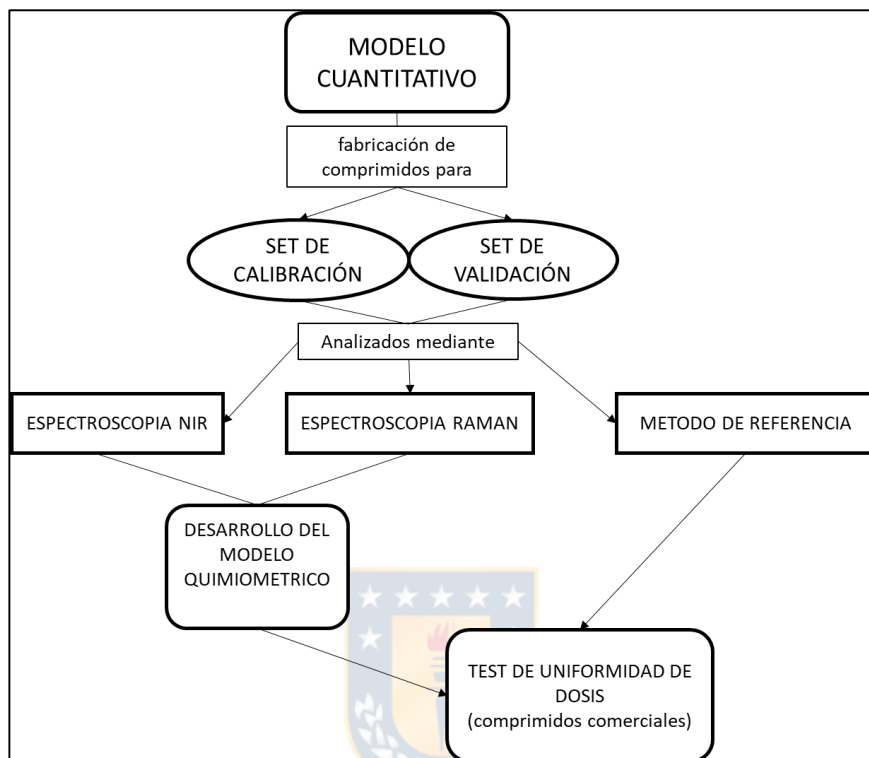
La homogeneidad del proceso de mezclado se estudió a través de distintas estrategias analíticas tanto cuantitativas como cualitativas, y así seleccionar aquella que se adapte de mejor manera a los requerimientos de la industria farmacéutica chilena, sin desprenderse de los actuales estándares de tecnología analítica empleados en esta área. El estudio contempló un análisis at-line de manera cuantitativa mediante espectroscopía NIR, y cualitativa mediante espectroscopía Vis-NIR. Además, con la finalidad de instruir en una primera instancia la iniciativa PAT en los laboratorios farmacéuticos nacionales, se evaluó de manera continua el proceso de mezclado mediante espectroscopía Vis-NIR, otorgando una alternativa a las actuales estrategias de análisis efectuadas tanto en la industria como en la academia. La Figura 3-1 muestra una descripción esquemática del estudio realizado para monitorear el proceso de mezclado farmacéutico en este trabajo.

**Figura 3-1:** Esquema del mecanismo por el cual se realizó el estudio de homogeneidad de mezclado



Otra problemática de la industria farmacéutica asociada a los controles de calidad efectuados a sus productos, hace alusión a la cuantificación de los principios activos en los comprimidos terminados (test de uniformidad de dosis). Como se mencionó en la introducción, el test de uniformidad de dosis se realiza mediante metodologías a base de técnicas cromatográficas previamente validadas, lo que convierte este test como uno de los más demandantes en cuanto a tiempo y dinero, considerando que cada comprimido se analiza por triplicado. Para dar solución a este problema, este trabajo propone la utilización de las espectroscopías NIR y Raman como técnicas alternativas a las cromatográficas para la realización de dicho test, estableciendo una comparación de ambas técnicas espectroscópicas en cuanto a su utilización en la industria para estos controles. La figura 3-2 muestra los pasos a seguir para el desarrollo de las metodologías utilizadas para la cuantificación de cada principio activo.

**Figura 3-2:** Representación esquemática de la estrategia analítica utilizada para la construcción de los modelos cuantitativos de espectroscopía NIR y Raman para la realización del test de uniformidad de dosis.



## CAPÍTULO IV

# **4. DETERMINACIÓN DE LA HOMOGENEIDAD DE MEZCLADO MEDIANTE EL USO DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS Y DISTINTAS ESTRATÉGIAS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO**



## **4.1. INTRODUCCIÓN**

Dentro de las etapas incluidas en el proceso de fabricación de un comprimido farmacéutico, la etapa del mezclado de los componentes es considerada como la más crítica y relevante para obtener productos con atributos de calidad mínimos para ser comercializados. El proceso de mezclado, por ende, es un tópico de estudio ampliamente demandado que está en constante perfeccionamiento en cuanto a técnicas analíticas para su monitoreo se trata. En este trabajo se realizó un estudio comparativo de diferentes técnicas cualitativas y cuantitativas para determinar el punto final del mezclado, y de esta forma hacer un análisis crítico de las ventajas y desventajas que presentan cada una de ellas. Además, se plantean metodologías analíticas alternativas más económicas y más fáciles de implementar que las comúnmente usadas para este fin.



## **4.2. EXPERIMENTAL**

### **4.2.1. DESARROLLO DEL MODELO CUANTITATIVO NIR**

En presente apartado se detalla el procedimiento por el cual se construyó el modelo predictivo que sirvió como herramienta para determinar cuantitativamente el tiempo óptimo del mezclado farmacéutico estudiado

#### **4.2.1.1. MUESTRAS DE CALIBRACIÓN**

Para este estudio, el set de calibración debe abarcar un amplio intervalo de concentraciones de tal forma que cubra las posibles concentraciones en las que se podría encontrar cada API durante el proceso de mezclado. Para ello, las muestras de calibración se formularon a través de un diseño D-Optimal con cinco niveles de concentraciones por API; -3.4, -2, 0, 2, 3.4, equivalente a 7.3%, 15%, 23.6%, 35.0%, 40.1% p/p para paracetamol

y ácido acetilsalicílico. Y 3.8%, 5.0%, 6.8%, 8.5%, y 9.7 %p/p para cafeína. Los niveles de concentraciones que no cubrió el diseño fueron incluidos de manera manual, dando como resultado 65 mezclas de calibración en donde se abarcó un intervalo de concentraciones entre 0.2-98%p/p dependiendo el API. La figura 4-1 muestra gráficamente el espacio de concentraciones cubierto por el set de calibración formulado.

La construcción de las muestras de calibración se llevó a cabo por pesada directa de los componentes puros, así es posible excluir análisis mediante un método de referencia. Para incluir la variabilidad proveniente de los excipientes, se preparó una matriz que incluyó las concentraciones nominales de cada excipiente (matriz 1) y dos mezclas de excipientes adicionales con variaciones de 80 y 120% con respecto a las concentraciones nominales de cada excipiente (matriz 2 y 3 respectivamente). Finalmente el set de calibración se conformó por 21 muestras con matriz 1, 22 con matriz 2 y 22 con matriz 3. Además, para emular el proceso de producción industrial y obtener los tamaños de partículas adecuados, cada componente de la mezcla fue tamizado con un tamiz número 16 según lo indicado por el laboratorio farmacéutico.

#### *4.2.1.2. MUESTRAS DE VALIDACIÓN*

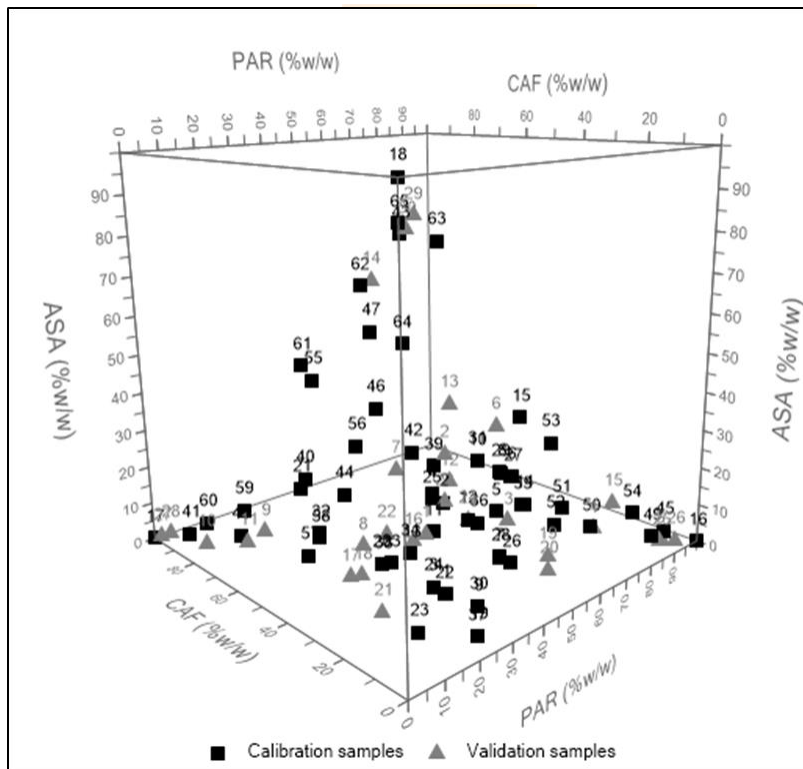
Para corroborar la capacidad predictiva del modelo, se prepararon 30 mezclas previamente tamizadas y con diferentes concentraciones de API dentro del intervalo abarcado por el set de calibración. Las variaciones de excipientes se incluyeron de la misma forma señalada anteriormente contemplando 10 muestras con cada matriz. Para evitar un posible efecto sistemático debido a las variaciones instrumentales diarias, todas las muestras (calibración y validación) se analizaron siguiendo un esquema aleatorio en diferentes días.



#### 4.2.1.3. CONSTRUCCIÓN Y EVALUACIÓN DEL MODELO CUANTITATIVO

La construcción del modelo cuantitativo se realizó mediante una regresión PLS con una validación cruzada completa mediante el mecanismo LOO. Luego de identificar el mejor modelo en base a los criterios convencionales mencionados en el apartado anterior, se evaluó el modelo analíticamente en términos de la especificidad del API, robustez (variación cuantitativa del excipiente), precisión (mediante precisión intermedia registrando 10 veces consecutivas la misma muestra en 7 días diferentes) y exactitud (a través del error predictivo del set de validación).

**Figura 4-1:** Representación gráfica de las concentraciones de cada API incluidas en el set de calibración y validación.



#### **4.2.2. PRETRATAMIENTO ESPECTRAL**

Todos los espectros registrados con el espectrofotómetro FT-NIR Bruker, tanto los utilizados para la construcción del modelo cuantitativo como los destinados a las predicciones, se trataron mediante primera y segunda derivada, SNV y combinaciones de estos.

Los espectros registrados mediante el espectrofotómetro Ocean Optics VIS-NIR fueron transformados de reflectancia a unidades de absorbancia ( $\log_{10}1/R$ ), luego, para mejorar la calidad de los espectros se les realizó un suavizado con una ventana de 59 puntos seguido de un SNV.

#### **4.2.3. PROCESO DE MEZCLADO**

El proceso de mezclado estudiado se realizó en nuestro laboratorio a escala piloto siguiendo las pautas de trabajo utilizadas por el laboratorio farmacéutico, de esta manera se logró emular algunas de las condiciones de trabajo y procedimientos reales de la planta de producción.

Primero se realizó tamizando los APIs y excipientes con tamices número 16 y 40 respectivamente, posterior a ello se incorporó cada componente dentro del mezclador en las cantidades necesarias para completar un total de 200 g de mezcla correspondientes a un 40% de la capacidad total del mezclador. El mezclado se realizó a una velocidad de 30 RPM en un tiempo total de 8 minutos, tiempo suficiente para lograr un mezclado óptimo (1). El proceso se estudió de forma continua y discontinua (sin detener el mezclador para el registro espectral). El análisis discontinuo se llevó a cabo en intervalos de muestreo de 0.5 minutos, el tipo de muestreo y el camino para detectar el mezclado óptimo están

determinados por la técnica utilizada para el estudio.

Por otra parte, el estudio continuo se realizó mediante el espectrofotómetro Vis-NIR. En esta ocasión se montó un sistema que permitió registrar los espectros sin la necesidad de detener el mezclador. El detalle de esta metodología se explica más adelante.

#### **4.2.4. DETECCIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO DE MEZCLADO**

El modelo quimiométrico desarrollado en el apartado 3.2.2 se utilizó para detectar de forma cuantitativa el tiempo óptimo de mezclado. Sin embargo, esta tesis busca innovar en la forma de analizar este proceso crítico desarrollando y evaluando metodologías de análisis cualitativas. En la presente sección se describen las diferentes metodologías utilizadas para lograr este objetivo, en donde se incluyen distintas estrategias estadísticas que permiten un análisis cualitativo sin la necesidad de extraer porciones de muestras desde el mezclador.

##### *4.2.4.1. REGISTRO ESPECTRAL*

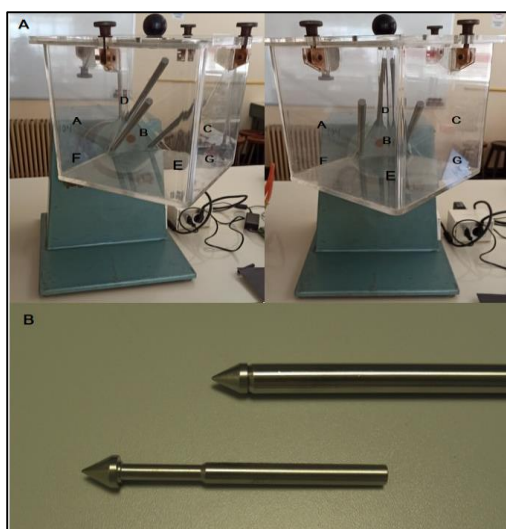
Como se mencionó en la introducción, algunos autores adherentes a la TOS señalan que el muestreo hace referencia a la obtención de la señal analítica, por lo que es necesario aclarar que en esta memoria cuando el autor habla de “muestreo” hace referencia al acto de extraer una porción del polvo a analizar desde el interior del mezclador, y NO a la obtención de los espectros.

El registro de los espectros para el estudio cuantitativo NIR at-line se realizó a través de un muestreo segregado, o *sampling thief*, en 7 zonas dentro del mezclador según se muestra en la figura 2-3A. La extracción de la muestra se efectuó con un recolector tipo lanza diseñado especialmente para este tipo de muestreo (figura 2-3A). En cada extracción se

recolectó 500 mg de mezcla, los que se introdujeron en un tubo ependedor para finalmente ser analizados por triplicado mediante espectroscopía NIR. Las muestras en polvo fueron colocados en viales directamente sobre la ventana del muestrador del instrumento. Se obtuvieron 3 espectros removiendo la muestra entre cada registro y se promediaron los espectros.

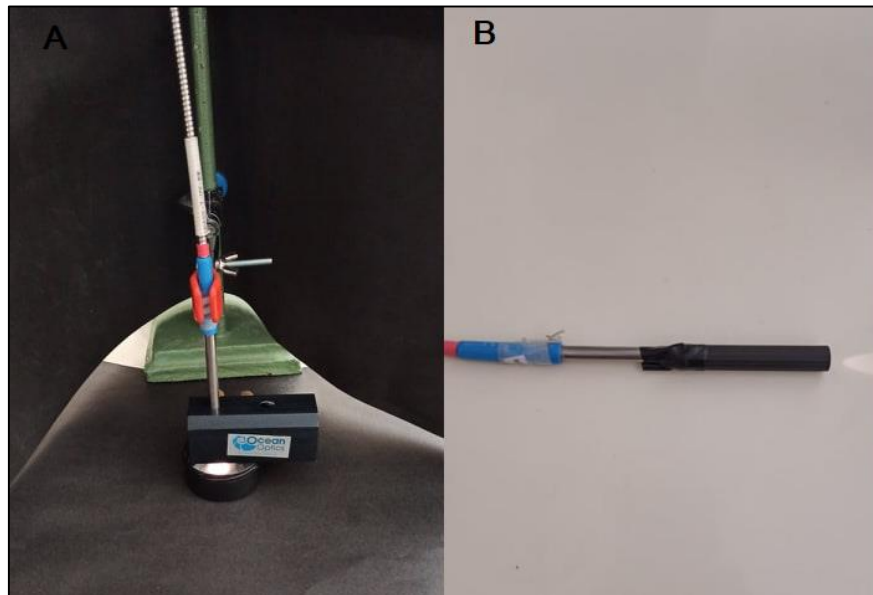
Para el estudio cualitativo con el espectrofotómetro Ocean Optics Vis-NIR, además del muestreo segregado, el registro espectral incluyó mecanismos que permitieron obtener espectros directamente desde la mezcla sin la necesidad de extraer porciones de ella. De esta manera se pretende reducir el error analítico que genera en el muestreo segregado sobre los resultados. A continuación se describen las estrategias utilizadas para la obtención de los espectros mediante el espectrofotómetro Vis-NIR, y que sirvieron para el análisis cualitativo de la mezcla farmacéutica

**Figura 4-2:** A) Zonas del mezclador en donde se realizaron los muestreos y registros espectrales; B) Muestreador tipo lanza (sampler thief) utilizado por la industria farmacéutica para realizar muestreos.



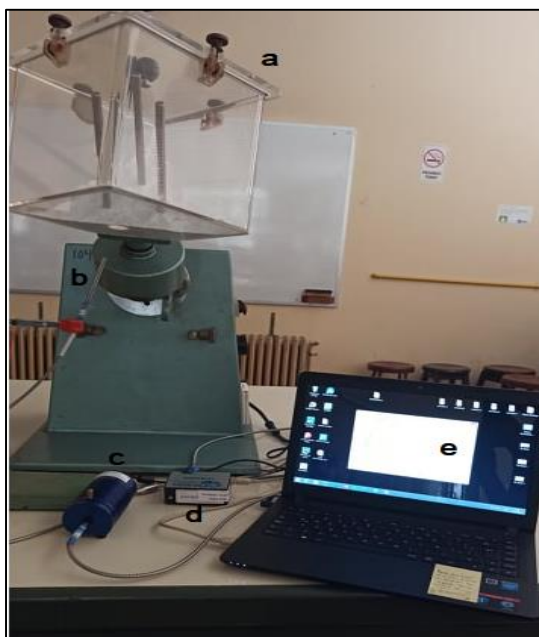
- A través de un muestreo segregado que contemplo la extracción de muestra en 7 zonas del mezclador (figura 2-3a). Cada muestra extraída se depositó en una placa petri negra semicerrada lo que permite disminuir la contaminación lumínica (factor de contaminación importante en este tipo de instrumentos). Luego, para mejorar la reproducibilidad de los registros espectrales, la muestra se aplanó con una espátula hasta alcanzar una capa de 3 mm aproximadamente, la fotografía de cómo se colocó la sonda para tomar el espectro se muestra en la figura 2-4A). Inmediatamente después de aplanar la muestra se le registraron 10 espectros en distintos puntos de la superficie del polvo. Finalmente la muestra extraída se reincorporó al mezclador para continuar con el proceso.
- Registrando los espectros directamente en los lugares establecidos dentro del mezclador. Para esta tarea, a la sonda del instrumento se le incorporó un conducto rígido en la parte superior, de esta manera es posible introducirla dentro del mezclador para el registro espectral sin que la superficie de la sonda tenga contacto con la muestra figura 2-4B. Los espectros se registraron por triplicado en cada zona establecida.

**Figura 4-3:** A) Mecanismo para la obtención de espectros Vis-NIR posterior al muestreo segregado; B) Acondicionamiento de la sonda para los registros desde el interior del mezclador.



- Registrando los espectros de forma continua. En esta ocasión, la sonda del instrumento se instaló fuera del mezclador en la zona inferior a una distancia constante de 5 cm como se muestra en la figura 2-5. El registro espectral se realizó cada 2 segundo (tiempo necesario para que el láser del instrumento registre el espectro en un mismo punto) registrando un total de 240 espectros en un mismo punto de manera continua durante todo el proceso de mezclado.

**Figura 4-4:** Configuración experimental del instrumento para el análisis del proceso de mezclado de manera continua.



a) Mezcladora; b) sonda; c) fuente; d) detector; e) computadora

#### 4.2.4.2. ANÁLISIS DE DATOS

##### **Determinación cuantitativa**

El análisis de datos para la determinación cuantitativa del tiempo óptimo de mezclado se realizó de manera similar al efectuado por la industria farmacéutica, según lo estipula la USP. Para ello es necesario cuantificar cada API en las zonas en las que se efectuó el muestreo, el mezclado es considerado homogéneo cuando la concentración de cada API alcanza un valor cercano al valor nominal del producto con un error relativo de un 10%, y además las concentraciones en cada punto del mezclador no debe diferir en más de un 3%. Estos mismoS criterios fueron adoptados en este estudio para determinar el tiempo de mezclado, cuantificando los APIs a través del modelo quimiométrico desarrollado mediante espectroscopía NIR.

## **Determinación cualitativa**

El análisis de datos para de determinación cualitativa de la homogeneidad de mezclado mediante el espectrofotómetro Ocean Optics Vis-NIR, contempló la evaluación múltiples métodos matemáticos ampliamente utilizados en espectroscopía NIR, y permiten evaluar el grado de variabilidad de un conjunto de espectros en función del tiempo.

a) Uno de los métodos más sencillos y comúnmente utilizado para este fin, es a través del denominado “Moving Block Standard Deviation” (MBSD) (2,3). Este método para determinar la homogeneidad durante un proceso de mezclado consiste en el cálculo de la desviación estándar para cada longitud de onda de un bloque móvil de varios espectros consecutivos que se van moviendo un espectro cada vez a través de los espectros registrados en la monitorización del proceso de mezclado. En el estudio de monitorización del proceso de mezclado se eligió un bloque móvil de 7 espectros. Así, el mezclado óptimo se alcanza cuando la desviación estándar relativa de espectros continuos alcanza un determinado valor de referencia.

b) Del MBSD surge otro algoritmo denominado “Difference Moving Block Average against Target Spectrum” (DMBA-TS) (4,5), el cual consiste en el cálculo de la diferencia de los valores obtenidos al promediar un bloque de espectros consecutivos (7 espectros en nuestro caso) que van moviéndose un espectro cada vez a través de los espectros registrados en la monitorización, contra un espectro objetivo (espectro de una mezcla considerada homogénea con la concentración nominal del principio activo). Después se calcula la desviación estándar de los valores obtenidos para todas las longitudes de



onda.

c) Además de las desviaciones estándar de un conjunto de espectros, las variaciones espectrales pueden determinarse mediante la Disimilaridad de los espectros. Para ello se calcula la diferencia entre dos espectros consecutivos (DIS) (5) o sobre un espectro de referencia (DIS-ATS) (6). Este mecanismo también incluye la determinación de la desviación estándar de las diferencias en todas las longitudes de onda, lo que permite observar la variabilidad espectral a lo largo del proceso. En todos los casos mencionados, la homogeneidad de la mezcla se logra cuando la desviación estándar relativa de los espectros analizados es inferior al 3%.

d) Como se mencionó en el capítulo I, el Análisis de los Componentes Principales es un algoritmo utilizado para encontrar pequeñas diferencias entre un determinado conjunto de datos, capturando la principal fuente de variación en las muestras y agrupándolas en un pequeño número de nuevas variables latentes o Componentes principales (PC). Esto convierte al PCA en una potente herramienta para determinar el punto final de mezclado a través del estudio de variabilidad de los scores, ya que estos describen con mayor certeza las causas más relevantes de variación del conjunto espectral.

- Una forma sencilla y confiable de determinar el tiempo óptimo de mezclado a través del PCA, es con MBSD aplicada sobre el conjunto de scores. De igual manera, una desviación estándar relativa de scores inferior al 3% indica homogeneidad de mezclado.
- El tiempo final de mezclado puede ser determinado también a través de  $T^2$  holling, el cual es un parámetro estadístico utilizado ampliamente para determinar si es que existen o no diferencias significativas en un conjunto de datos multivariables, con un

determinado intervalo de confianza, la  $T^2$  holling para observación  $i$ , basado en componentes  $A$  se define como:

$$T^2 = \sum_{a=1}^A \frac{t_{ia}^2}{s_{ta}^2} \quad \text{Ecuación 4.1}$$

donde  $s^2$  es la varianza de  $t_a$  según el modelo de clase.

El análisis contempló la evaluación del valor de  $T^2$  en función de cada score, el scores que cae por debajo del  $T^2$  crit (establecido en base al intervalo de confianza) es considerado como el score, o tiempo, en el que el mezclado está homogéneo, ya que, no posee diferencias espectrales significativas.

- Un tercer camino para determinar el punto final del mezclado a través del PCA, es el descrito por *Puchert et al*, el cual lo denominó Análisis de las Distancias de Scores de los Componentes Principales o PC-SDA (7). Para este análisis es necesario calcular las distancias euclidianas entre dos scores consecutivos y luego determinar la desviación estándar de dichas distancias para evaluarlas en dominio del tiempo.

Las distancias euclidianas se determinan mediante la siguiente ecuación:

$$d_1 = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2 + (z_2 - z_1)^2} \quad \text{Ecuación 4-2}$$

Mediante este método es posible crear un Espacio de diseño con un determinado intervalo de confianza representado por los scores con menor variabilidad, de esta manera el mezclado óptimo se alcanza cuando scores consecutivos caen dentro de este espacio diseño establecido.

#### 4.2.4.2. MÉTODO DE REFERENCIA

El tiempo óptimo de mezclado también fue determinado mediante la metodología de referencia utilizada en la industria farmacéutica, la que incluye una cuantificación de los

APIs por medio de un análisis cromatográfico según se describió en el apartado 1.6

Cada porción de la mezcla extraída durante el proceso se analizó con un HPLC Shimadzu Prominence (HPLC Modular) acoplado a un detector uv/vis modelo SPD-20A con una bomba modelo LC-AT y una columna RP-18 LiChroCART 125-4 (125 mm x 4 mm LiChrospher 100 tamaño de partícula 5  $\mu$ m). Un resumen del método cromatográfico se muestra en la Tabla 4-1.

**Tabla 4-1:** Características de la metodología HPLC utilizada como método de referencia.

Fase móvil	Agua: metanol: ac acético 69: 28: 3
Fase estacionaria	Columna Intersil C18
Flujo	1.5 mL / min
Volumen de inyección	20 $\mu$ L
Long de onda	275 nm
Tiempo de análisis	time 10 min
Disolvente	Metanol: ac acético 95: 5

### 4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los estudios efectuados en este capítulo contemplaron la determinación del tiempo óptimo de mezclado de forma cuantitativa mediante el análisis por espectroscopía NIR, y de forma cualitativa mediante espectroscopía Vis-NIR. Todas las metodologías desarrolladas se compararon con la metodología de referencia destinada a estos análisis, para así dar sustento estadístico a los resultados para posibles aplicaciones a nivel industrial.

### 4.3.1. ESPECTROSCOPÍA NIR

El análisis cuantitativo de la mezcla se llevó a cabo mediante el desarrollo de un modelo de calibración basado en espectroscopía NIR. En este apartado se muestran los datos relacionados con el desarrollo y evaluación analítica del modelo quimiométrico que sirvió para el estudio del proceso.

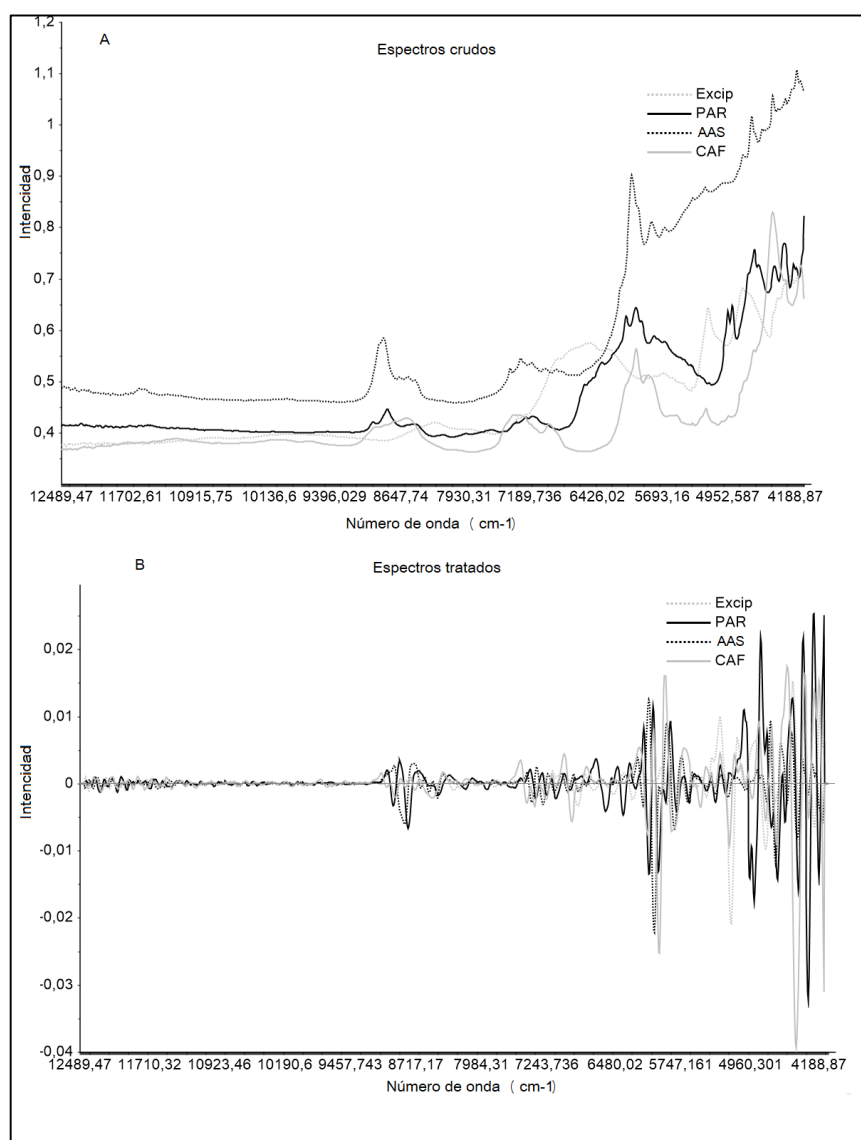
#### 4.3.1.1. PRETRATAMIENTO ESPECTRAL Y ANÁLISIS PREVIOS

El registro de los espectros se realizó en modo reflectancia y fueron transformados a unidades de absorbancia. Para evaluar el efecto del pretratamiento espectral, se registró el espectro de los tres APIs junto al espectro de una matriz de excipiente, los cuales se muestran en la figura 4-5A. De la misma forma, la figura 4-5B muestra lo mismo espectros pero esta vez pretratados con un SNV seguido de la segunda derivada usando la transformación Savitzky-Golay con una ventana de 15 puntos en el intervalo de  $12489\text{ cm}^{-1}$  y  $3702\text{ cm}^{-1}$ . Después del preprocesamiento, se logra apreciar una clara disminución de diferencias espectrales provenientes de las fuentes básicas de variabilidad espectral, como el tamaño de partícula u otras variabilidades físicas. La bibliografía describe esta combinación de tratamientos como la más adecuada para el uso de NIR, y basándonos en los resultados mostrados en la sección anterior, se decidió utilizar estos algoritmos para pretratar todos los espectros utilizados en la construcción del modelo PLS para este estudio.

El set de calibración consistió en un conjunto de 65 mezclas preparadas por pesada, las cuales su total abarcaron un amplio intervalo de concentraciones para cada API. Por su parte, el set de validación se construyó de la misma manera y quedó conformado por 30

mezclas de polvo con concentraciones de API dentro del rango abarcado por el set de calibración

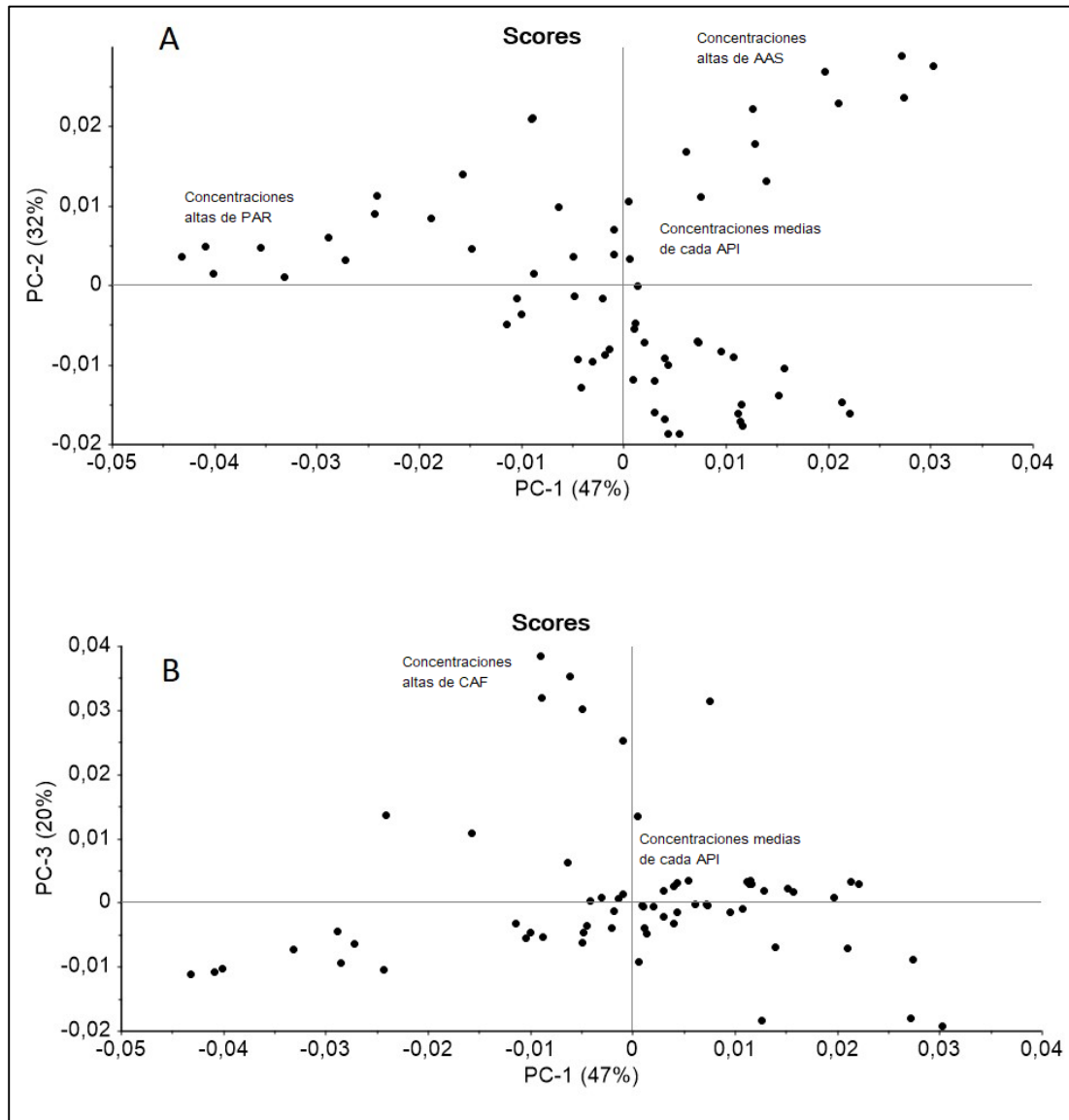
**Figura 4-5:** Representación de los espectros crudos A) y B) tratados mediante SNV seguido de una 2D de 15 puntos, provenientes de cada API y de una matriz de excipientes.



Previo a la construcción del modelo PLS se le realizó un PCA sobre las 65 mezclas del conjunto de calibración utilizando el pretratamiento espectral señalado anteriormente.

La figura 4-6A y 4-6B muestra la distribución espacial de todas las muestras en función de los 3 primeros componentes principales. Estas tres variables latentes en su totalidad suman un 98.5 % de la varianza explicada, 47% para el PC1, 32% para el PC2 y 20% para el PC3, lo que demuestra una alta representatividad de la matriz original en la nueva matriz reducida. Si relacionamos las concentraciones de las muestras con su distribución en los distintos ejes, podemos apreciar que aquellas mezclas en las que predominan concentraciones medias de los APIs (20-60 %p/p) tienden a agruparse en el centro de la gráfica. Por otra parte, aquellas muestras en donde el porcentaje de uno u otro API se encuentra por sobre el valor de 60% o inferiores al 15%, tienden a distribuirse hacia los extremos del componente en la medida que varía la concentración estas. Por ejemplo, en los extremos con valores negativos del PC1 se posicionan las muestras con concentraciones elevadas de PAR, mientras que las de concentraciones bajas están agrupadas en zona de scores positivos, indicando que este PC explica mayoritariamente la información física que proporciona PAR en la mezcla total. Por otro lado, los valores de scores positivos en los PC2 y PC3 agrupan las muestras con concentraciones elevadas de AAS y CAF respectivamente, mientras que en la zona de scores negativos se agrupan las muestras con concentraciones bajas. De esto se deduce que las principales diferencias que detecta el PCA en el conjunto de calibración se deben en gran medida a las diferencia de concentraciones que hay entre cada muestra, las cuales son representadas a través de los tres primeros PCs.

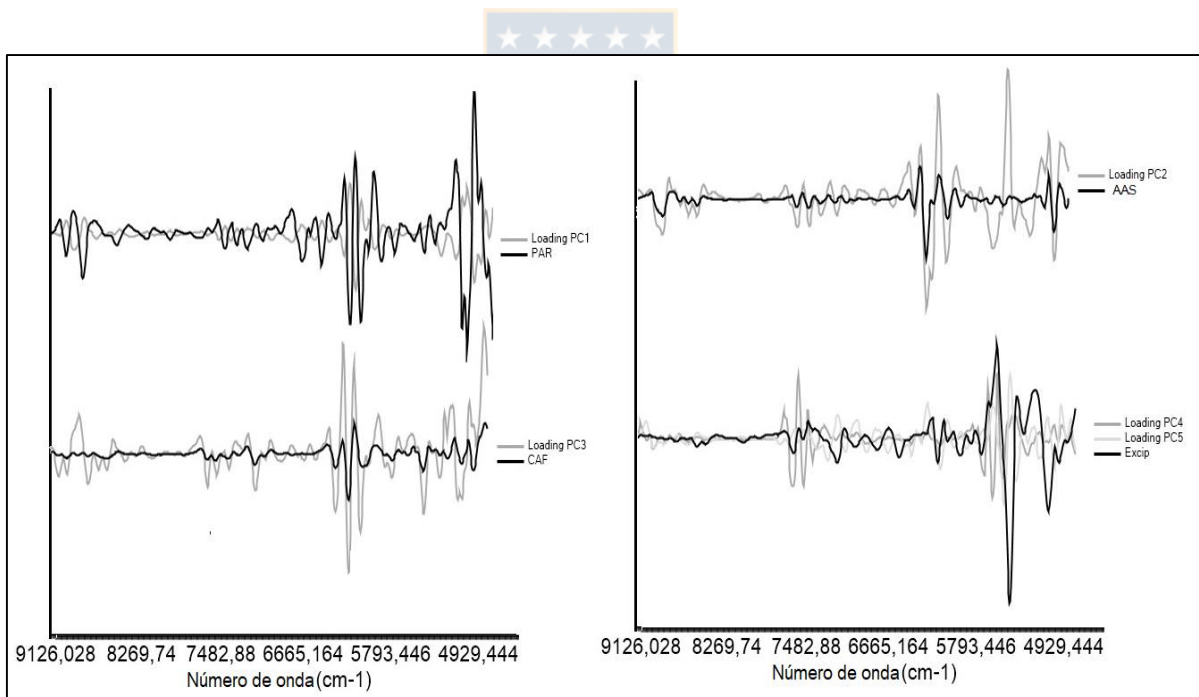
**Figura 4-6:** Distribución espacial de las muestras de calibración en relación a los tres primeros componentes principales obtenidos al realizar un PCA sobre la totalidad del conjunto. El PCA se validó mediante un validación cruzada completa (LOO) y el tratamiento de los espectros consistió en un SNV seguido de una 2D con una ventana de 15 puntos.



Esta información se corrobora al observar la figura 4-7, en donde se representan los espectros puros de cada API y de la matriz de excipientes junto con la representación lineal de los loading de los PC1-5. Al observar la superposición del Loading del PC1 con el

espectro puro del PAR queda en manifiesto la elevada correlación negativa que existe entre ambas graficas a lo largo del espectro lo que explica la distribución de las muestras en la figura 4-6. De igual forma, los loading del PC2 y PC3 poseen una correlación de las señales positiva con las bandas de los espectros de AAS y CAF respectivamente. Esto indica, a priori, una alta selectividad la cual debe ser demostrada incluyendo los valores de concentraciones de cada API. Por su parte, los loading del PC4-5 explican mayoritariamente información proveniente de los excipientes, demostrando de una manera exploratoria una diferenciación de cada componente de la mezcla.

**Figura 4-7:** Comparación del espectro de los componentes puros de cada API con la representación lineal del loading del PC1 obtenidos a partir de los modelos PLS NIR.

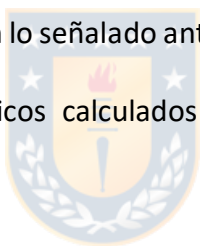




#### 4.3.1.2. CONSTRUCCIÓN Y EVALUACIÓN DEL MODELO PREDICTIVO

Los modelos PLS utilizados para cuantificar cada API se construyeron a partir del análisis de 63 de mezclas de calibración, excluyéndose dos muestras consideradas como *outliers* (detectadas a través del análisis estadístico con criterio Hotelling T<sup>2</sup>). Se evaluaron varios modelos de cuantificación, evaluándose el intervalo espectral de trabajo y el pretratamiento utilizado. Finalmente, cada modelo quimiométrico se construyó en el intervalo espectral de 9126-4520 cm<sup>-1</sup> y todos los espectros fueron tratados con SNV seguido de la segunda derivada con una ventana de 15 puntos.

El poder predictivo de cada modelo se evaluó mediante el análisis del RMSECV obtenido a partir de la validación cruzada LOO, y del RMSEP obtenido de las predicciones del set de calibración externa construido según lo señalado anteriormente. La tabla 4-2 muestra un resumen de los parámetros analíticos calculados para los modelos que entregaron mejores predicciones.



**Tabla 4-2:** Cifras de mérito obtenidas en las predicciones de los mejores modelos PLS desarrollados para cada API.

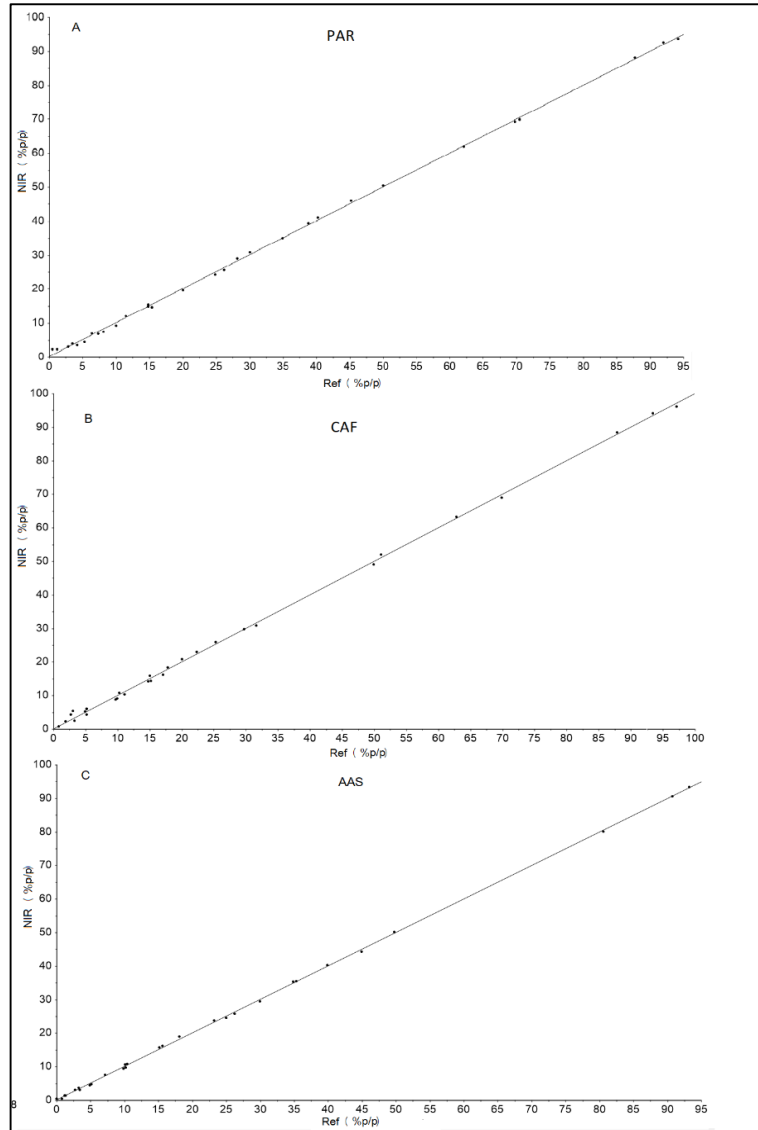
API	Nº m.c	Nº m.v	Interval de concentració (%p/p)	RMSECV (%p/p)	RMSEP (%p/p)	R <sup>2</sup>	Precisión (rep/int prec)	Nº PC	Variance explained (%)
PAR	62	30	0.21-98.53	1.07	0.71	0.981	1.59/1.35	4	98
CAF	62	30	0.51-98.32	1.15	0.89	0.978	1.85/1.54	4	98
AAS	62	30	0.23-99.12	0.92	0.44	0.992	1.38/1.41	4	99

m.c: muestras de calibración m.v: muestras de validación

El RMSEP de tres modelos de calibración está dentro de un rango aceptable que va de 0.44% a 0.89% dependiendo el API, por su parte, los valores de RMSECV fluctuaron entre 0.91% a 1.15%. Para los tres modelos de calibración se obtuvo un valor RMSEP menor que

el RMSECV, lo que indica una alta capacidad predictiva del modelo y con ausencia de un sobreajuste en los espectros de las muestras. Para las predicciones de PAR y CAF los modelos fueron capaz de predecir con gran exactitud la mayoría de las muestras en los intervalos de concentraciones establecidos, los mayores errores de predicción se observaron en aquellas mezclas con concentraciones extremas y opuestas entre ambos APIs, es decir, máxima concentración de CAF con mínima de PAR y viceversa. Ambos APIs tienen bastantes variables en común superpuestas (Figura 4-5b) y eventualmente podría comprometerse el rendimiento de la predicción en esas combinaciones de concentraciones. Sin embargo en las muestras de calibración con concentraciones nominales de cada API fueron predichas con gran exactitud con RMSEP inferiores al 0.5%, soportando las variaciones de la concentraciones de los excipientes incluidas en el set validación. La representación gráfica de las predicciones se muestra en la figura 4-8. Es evidente la excelente coincidencia entre los valores predichos NIR y los de referencia HPLC, con una pendiente de 0.981 para PAR, 0.978 para CAF y 0.992 para AAS. Además, los test t pareados (entre los valores predichos NIR y los HPLC de referencia para el contenido en API de los comprimidos individuales de cada dosificación muestran que no existen diferencias significativas.

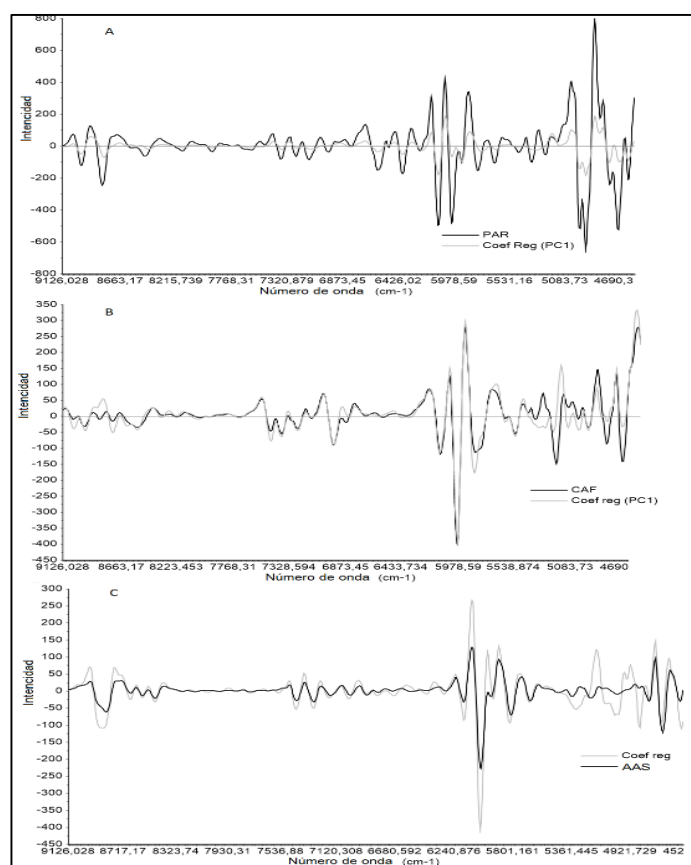
**Figura 4-8:** Comparación gráfica de los valores de concentración predichos mediante los modelos PLS desarrollados con los valores de referencias de cada API.



La especificidad del modelo se puede demostrar comparando los coeficientes de regresión del primer PC con los espectros puros de los ingredientes, esta representación se puede apreciar en la figura 4-9. A lo largo del intervalo espectral utilizado para la construcción de los modelos, los coeficientes de regresión del PC1 indican fuertes coincidencias espectrales con algunas señales de los espectros para cada API, siendo en

el intervalo comprendido entre los 8500-4500  $\text{cm}^{-1}$  donde se encuentran las variables que contienen la mayor información diferenciadora para cada API, sobresaliendo la gran capacidad para detectar el AAS por sobre los otros dos APIs. Esta información, en conjunto con la entregada por el PCA (figura 4-6) demuestran que los modelos de calibración son específicos para cada API y, por lo tanto, capaces de predecir los analitos con la ayuda de cuatro componentes principales, dejando en manifiesto que la variabilidad de los excipientes esta explicada por los PC4-5 y no afectan la predicción de las muestras.

**Figura 4-9:** Comparación de los espectros puros de cada API con la representación lineal de los coeficientes de regresión del primer PC obtenidos en los modelos PLS.



### **4.3.2. ESPECTROSCOPÍA VIS-NIR**

La determinación cualitativa del tiempo óptimo de mezclado ha sido un tópico ampliamente estudiado a lo largo de las últimas dos décadas, para ello la espectroscopía NIR ha desempeñado un rol fundamental como herramienta de análisis. Sin embargo, el uso de la espectroscopía Vis-NIR en este campo es nulo, destinándose su aplicación básicamente al análisis de muestras líquidas o alimentos para animales (8,9). En este contexto, la presente sección muestra los resultados que demostraron la factibilidad de realizar análisis de mezclas farmacéuticas sólidas mediante esta técnica.

#### *4.3.2.1. PRETRATAMIENTO ESPECTRAL Y ANÁLISIS PREVIOS*

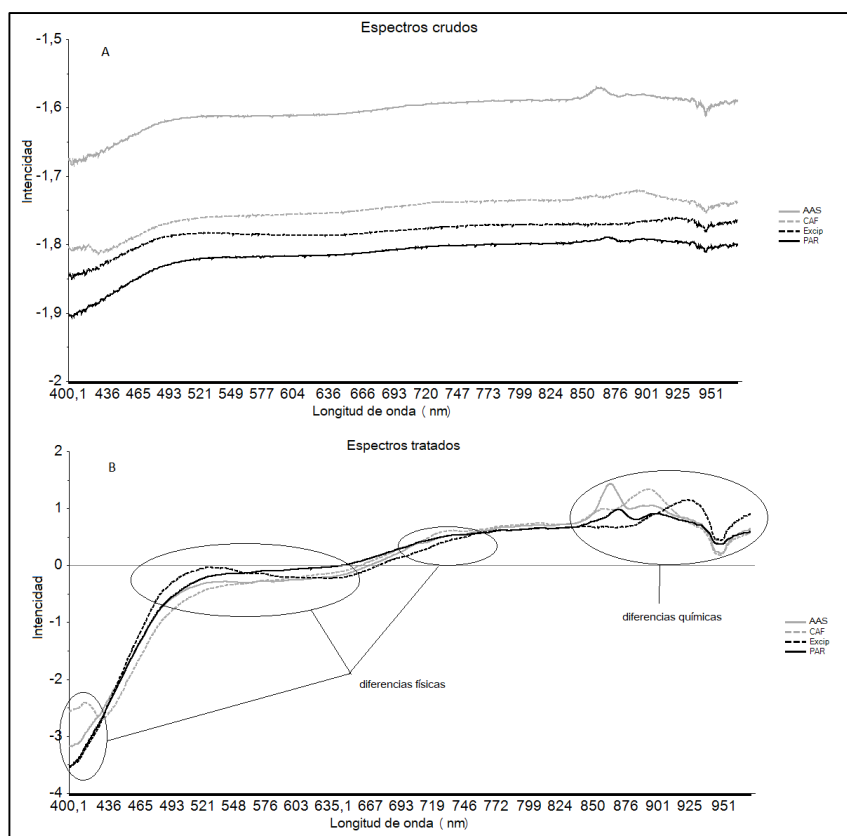
Los análisis previos en espectroscopía Vis-NIR permitieron evaluar el desempeño de la técnica en orden de diferenciar los distintos componentes contenidos en la mezcla farmacéutica. La importancia de este estudio radica en la poca absorción que poseen los analitos en el intervalo espectral de trabajo.

Para ello se obtuvieron los espectros puros de los tres principios junto con el espectro de una mezcla de excipiente en sus concentraciones nominales, en el intervalo espectral de 380-1100 nm, sin embargo debido a la gran cantidad de ruido presentada en las zonas extremas del espectrograma, todos los espectros fueron obtenidos en el intervalo entre 400-970 nm. Para disminuir las diferencias espectrales asociadas a la dispersión de luz, se aplicó un pretratamiento espectral que consistió en un suavizado con una ventana de 59 puntos seguido de un SNV.

La figura 4-10 muestra el efecto del tratamiento espectral aplicado sobre los espectros de cada componente, se logra apreciar una notable disminución del ruido que va de la mano

con aumento considerable de la resolución de algunas bandas, especialmente al inicio del espectrograma y sobre los 850 nm. En estas zonas es donde existe la mayor diferenciación producto de las características química de cada componente. Por otro lado, en el intervalo que contempla la región del visible, debido a la pobre absorción energética, predominan las diferencias resultantes del recorrido que realiza el haz de luz del instrumento, el cual está relacionado con las características físicas de las partículas (forma y tamaño principalmente).

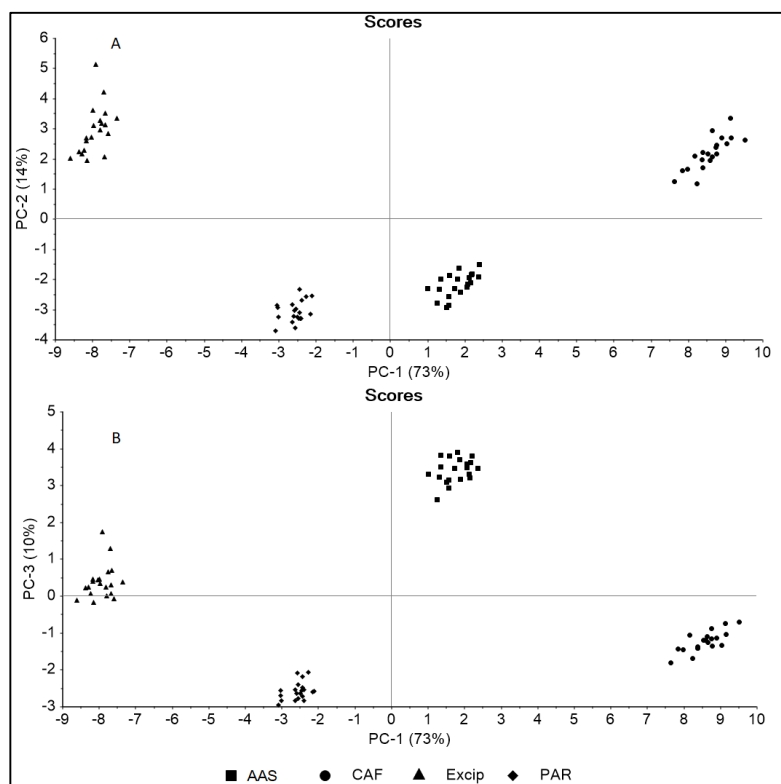
**Figura 4-10:** Espectros de cada API y de una matriz de excipientes crudos (A) y pretratados con un suavizado de 59 puntos seguido de un SNV



Para analizar con más detalles cuáles son las variables que explican las principales diferencias entre cada API, se realizó un PCA sobre 80 espectros provenientes de los tres

ingredientes activos y de la mezcla de excipientes (20 espectros de cada API y 20 espectros de la matriz de excipientes). A cada espectro se le realizó un suavizado con una ventana de 59 puntos seguido de un SNV, la validación del PCA se hizo mediante una validación cruzada completa con 80 segmentos. Los resultados del análisis se observan en la figura 4-11A, B, en donde se muestra la distribución de los cuatro grupos analizados en relación a los primeros 3 PC (97% de la varianza explicada).

**Figura 4-11:** Distribución espacial de los scores sobre los 4 primeros componentes principales obtenidos al realizar un PCA sobre los espectros de cada API y la matriz de excipientes.



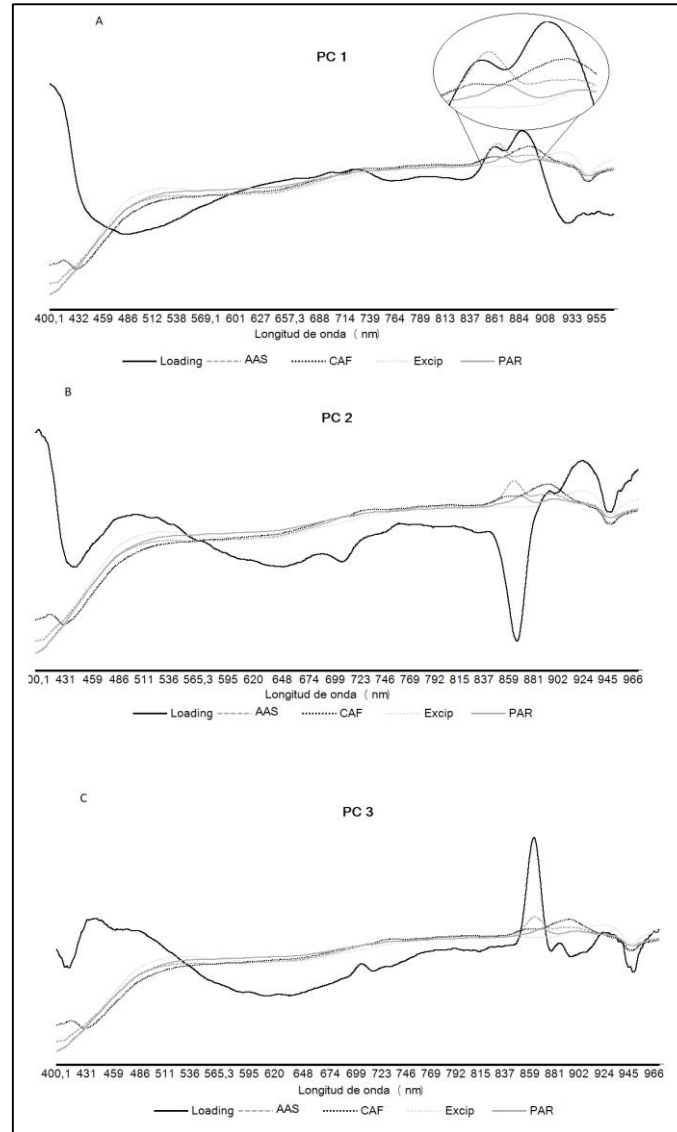
Queda en manifiesto una clara separación de los cuatro grupos en estudio, en donde el PC1 con un 73 % de la varianza explicada, es capaz de diferenciarlos a lo largo de su eje. Dentro de este PC se explican mayoritariamente las diferencias espectrales de la cafeína

en relación a la matriz de excipientes influenciadas por las variables correspondientes a los 400-430 y 870-945nm. Estas variables tienen una considerable correlación positiva con la cafeína, sobre todo en la zona de los 400 nm, facilitando su diferenciación de los otros componentes. El resto de las variables explican las pequeñas diferencias físicas de las muestras las que ayudan en menor medida a separar los cuatro grupos. Esto se puede deducir también analizando la figura 4-12 en donde muestra una representación lineal de los loading de los tres primeros (figura 4-12 A, B, C) junto con los espectros de los APIs y de la matriz de excipientes.

El PC2 con un 14% de varianza explicada contiene información que ayuda a diferenciar la cafeína y los excipientes, del paracetamol y el ácido acetil salicílico. Esta información está representada principalmente por las variables de la zona entre los 840 y 880nm las cuales mantienen un correlación positiva con AAS y PAR pero negativa para CAF y Excip. Por su parte, el PC3 con un 10% de la varianza explicada logra diferenciar el paracetamol del ácido acetil salicílico utilizando también las variables de los 840 y 880nm, las cuales son variables con una mayor influencia de AAS que de PAR, eso explica la correlación positiva para el primero y negativa para el segundo, ver figuras 4-11B y 4-12C.



**Figura 4-12:** Representación lineal de los loading de los tres primeros PC (A: PC1, B: PC2, C: PC3) junto con los espectros de los APIs y de la matriz de excipientes.



Los resultados demuestran que los espectros obtenidos mediante espectroscopía Vis-NIR extraen pequeñas informaciones física y química de cada componente haciendo posible su diferenciación mediante un adecuado tratamiento de datos y un Análisis de los Componentes Principales, pudiendo así eventualmente detectar diferencias cualitativas en un proceso de mezclado para su uso en la industria farmacéutica.

### **4.3.3. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO DE MEZCLADO**

En los párrafos que siguen se muestran los resultados obtenidos al estudiar un proceso de mezclado a través de las metodologías descritas anteriormente, los resultados se presentan en dos apartados, diferenciando el tiempo obtenido de forma cuantitativa y de forma cualitativa.

#### *4.3.3.1. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA*

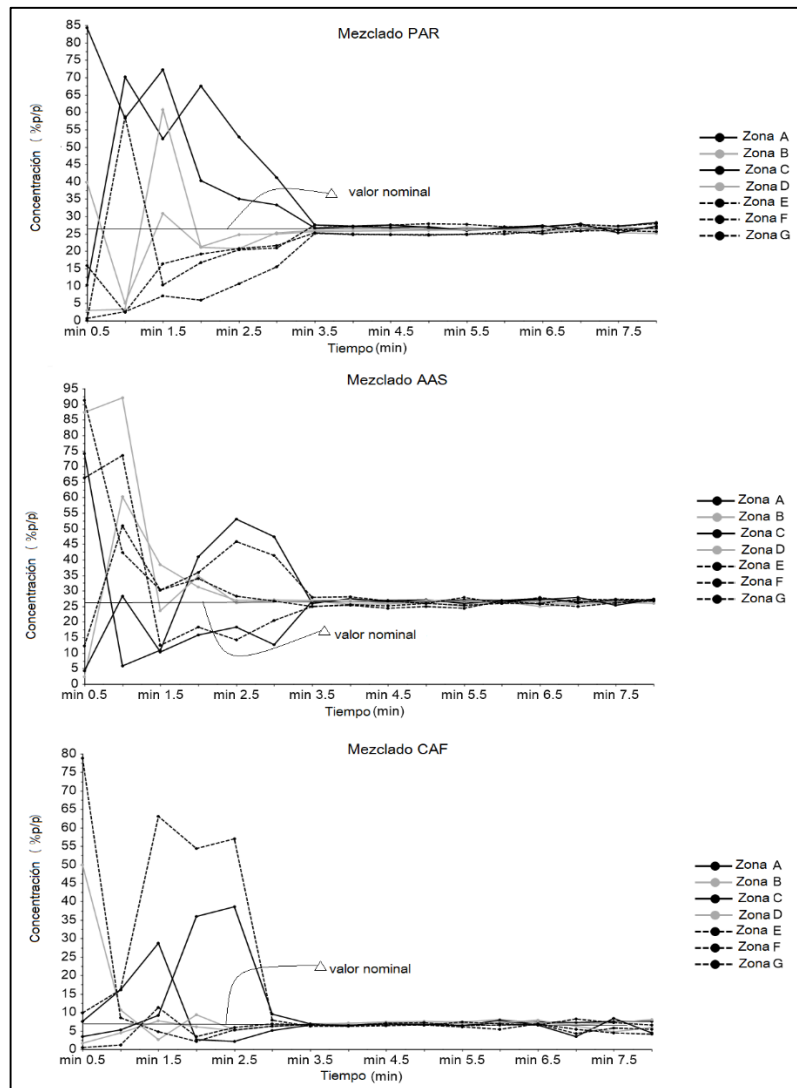
Para la determinación cuantitativa se utilizó el modelo PLS desarrollado mediante espectroscopía NIR. Si bien estos métodos son mucho más complejos debido a la necesidad de construir un modelo de calibración, esta metodología no sólo determina el tiempo de mezclado óptimo, sino que también proporciona información relevante respecto a los valores de concentraciones de los APIs en cada punto del mezclador a lo largo del proceso.

Los resultados de este análisis se muestran en la figura 4-13, donde se representan las concentraciones de API predichas a lo largo el proceso de mezclado. El tiempo donde la concentración de cada API en las zonas muestreadas se vuelve constante y no difieren de un 5% del valor nominal es considerado un mezclado óptimo.

De la gráfica se puede observar que la mezcla alcanza la homogeneidad a los 3.5 min con desviaciones estándar menores al 2% entre las distintas zonas muestreadas y hasta el final del proceso, lo que indica ausencia de un desmezclado de los componentes. Sin embargo, la cafeína a partir de los 6.5 min demuestra pequeñas variaciones que van de entre 2-2.8 %, estos valores son bajos para ser considerar un fenómeno de desmezclado, pero merece especial atención considerando que este API logró su homogeneidad antes de los 3 min,

a diferencia de PAR y AAS que alcanzaron la homogeneidad a los 3.5 min. Esto se debe básicamente a que la cafeína es el componente en menor concentración y es el API con menor tamaño de partícula, lo que se traduce en una mayor fluidez, y por consiguiente facilita su homogeneidad durante el mezclado.

**Figura 4-13:** Evaluación de la homogeneidad del mezclado cuantitativamente mediante espectroscopía NIR.



Como era de esperarse, en las zonas de muestreo críticas (E, F y G) fueron las que mayor tiempo tardaron en alcanzar una concentración de API constante, debido al poco flujo

que genera el mezclador en dichas zonas. Esto produjo que las concentraciones presentaran una variabilidad gradual de concentración de API a lo largo del tiempo, hasta estabilizarse a los 3.5 min. En las zonas de muestreo restantes, existió una mayor variabilidad respecto a las concentraciones de cada API, sobre todo en las zonas centrales del mezclador en donde el flujo de mezcla es constante. En estas zonas antes de los 3 min las concentraciones se aproximaron su valor nominal dejando en manifiesto las diferencias de mezclado que existe dependiendo de dónde se extraiga la muestra.

#### 4.3.3.2. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

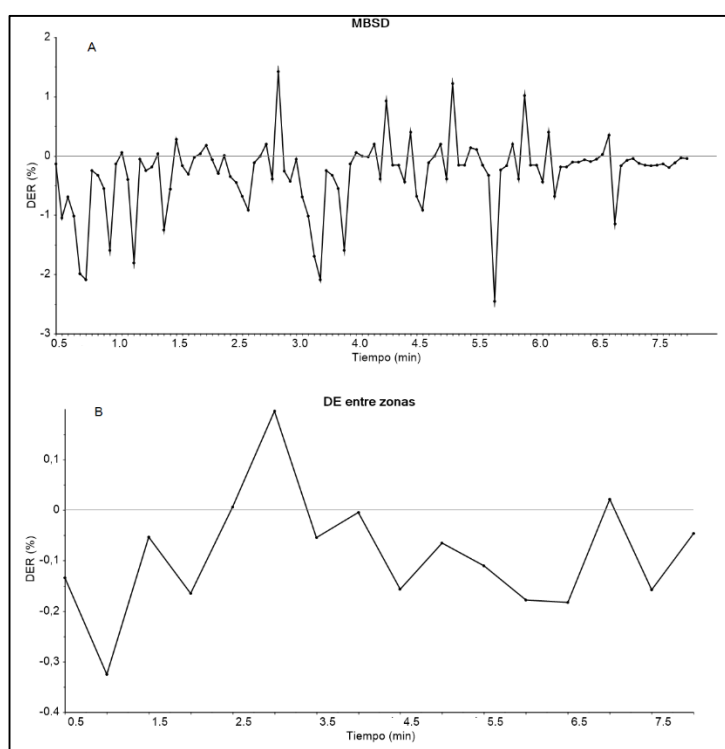
En esta parte del estudio, se han monitorizado diferentes procesos de mezclado simulando el realizado por el laboratorio farmacéutico que patrocinó la investigación. Los espectros registrados durante la mezcla se trataron con los algoritmos descritos en la sección 4.2.4.2, y así establecer los más apropiados y precisos para la identificación del punto final de mezcla, con garantía estadística que demuestre una baja sensibilidad a las oscilaciones propias producidas por el propio registro.

Los resultados de este análisis se muestran de acuerdo a la forma en la que se registraron los espectros; muestreo segregado, registros desde el interior del mezclador y análisis continuo.

**a) Muestreo segregado:** El monitoreo del proceso de mezclado mediante el muestreo segregado permitió obtener 35 espectros (correspondientes a 5 registros en las 7 zonas muestreadas) cada 0.5 min, El análisis de datos se realizó sobre el promedió de los 5 espectros de cada zona (7 espectros/0.5 min) para una representación espectral individual de cada muestreo.

El primer método utilizado para determinar el tiempo óptimo fue mediante el análisis de la variabilidad espectral de un grupo de espectros a través de las desviaciones estándar (DE) de sus intensidades. Este análisis se aplicó sobre un bloque de 7 espectros de manera continua a lo largo de todo el proceso (MBSD), y de manera independiente sobre los 7 espectros obtenidos en cada intervalo de muestreo. En ambos casos la homogeneidad de la mezcla se detecta cuando las desviaciones estándar de los espectros logran una estabilidad representada por un RSD menor 3%. La figura 4-14 muestra los resultados de esta evaluación.

**Figura 4-14:** Evaluación de la homogeneidad del mezclado cualitativamente mediante espectroscopía Vis-NIR utilizando MBSD.



Los gráficos presentados indican que no hay una relación en los datos que pueda ser interpretable para el objetivo planteado. En la gráfica de la MBSD (figura 4-14A) no es posible observar ningún estado de referencia en donde las SD se hacen constantes, de

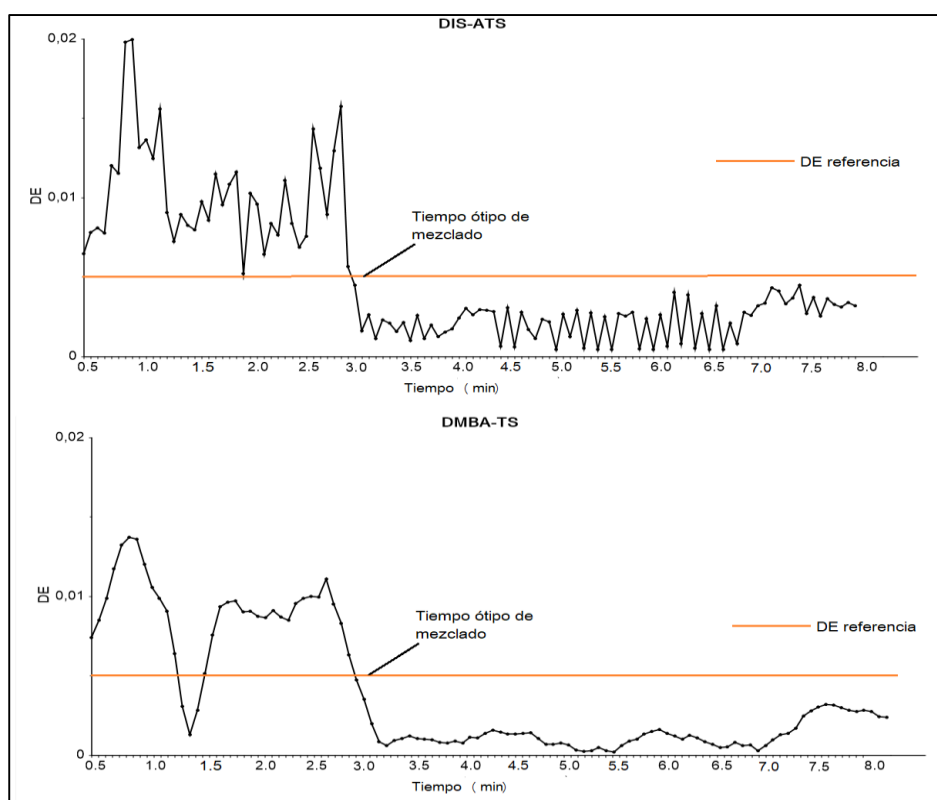
igual forma, si se observan las RSD de los espectros en cada zona muestreadas (figura 4-14B) se logra apreciar que sólo un bloque de muestreo obtuvo un valor de RSD en los límites establecidos, no obstante, al bloque siguiente el valor vuelve salirse de los límites. Esto sugiere que el mezclado no alcanzó un estado estable después que el proceso concluyó, sin embargo, esto es muy poco probable por lo que la principal explicación se debe a que la información redundante, la variación aleatoria y el ruido espectral proveniente de la técnica opacan a la información contenida en la mezcla lo que imposibilita el estudio cualitativo mediante la evaluación de la variabilidad espectral.

Continuando con la evaluación de metodologías estadísticas para analizar los espectros, se aplicó la estrategia de Disimilaridad sobre espectros continuos (DIS), Disimilaridad de espectros individuales sobre un espectro de referencias (DIS-ATS) y las Diferencias entre el promedio de 7 espectros en una ventana móvil y un espectro considerado como referencia (DMBA-TS). El espectro de referencia se obtuvo a través del promedio de 10 registros realizados a 5 muestras comerciales previamente molturadas. La desviación estándar de estos registros para la muestra de referencia dio un valor de desviación estándar (DE) de 0.005, por lo que en esta ocasión, el mezclado óptimo se alcanza cuando la DE de las diferencias espectrales caen bajo este valor establecido. Los resultados de este estudio se muestran en la figura 4-15.

Los resultados obtenidos mediante los diferentes métodos de disimilaridad presentan un comportamiento variable. En relación la estrategia DIS, los resultados obtenidos fueron comparables con los obtenidos a través de MBSD, es decir, no fue posible detectar un valor de DE en las diferencias espectrales que indiquen una homogeneidad de mezclado.

Sin embargo, al incluir un espectro de referencia en los cálculos matemáticos, la interpretación de los resultados hizo posible detectar valores de DE que se acercaron de una forma gradual a los valores de una muestra referencia, y por tanto son resultados más acordes a los obtenidos por la metodología cuantitativa, lo que nos da a entender que estos métodos son más adecuados que los anteriores para detección del punto final del mezclado.

**Figura 4-15:** Evaluación de la homogeneidad del mezclado cualitativamente mediante espectroscopía Vis-NIR utilizando DIS-ATS (A) y DMBA-TS (B).



El método DMBA-TS mostró cambios más uniformes respecto a DIS-ATS, por el efecto del alisado producto el cálculo del promedio en la ventana móvil de 7 espectros, lo que hace a este método menos sensible al ruido producido por el propio equipo. Sin embargo, en ambos casos se determinó que el tiempo de mezclado se logra a partir del min 3.5. Cabe

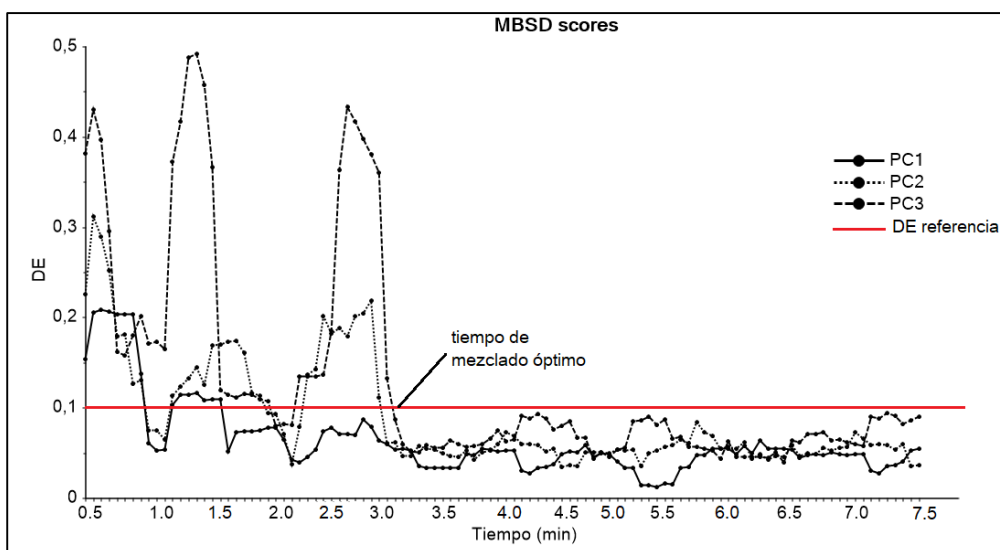
resaltar que algunas zonas muestreadas al minuto 3.0 también alcanzaron el valor de DE establecido, no obstante, es al minuto 3.5 en donde la totalidad de los muestreos caen dentro de los límites prefijados.

La aplicación de estos métodos en el proceso de mezclado mostró diferencias sustanciales en su capacidad para identificar el punto final en el proceso de mezclado. Por un lado, MBSD y DIS fueron incapaces de detectar con precisión la uniformidad de mezcla debido a que estas estrategias no son adecuadas para detectar cambios de concentraciones graduales y son sensibles a los problemas de ruido. Por otro lado, los métodos basados en DMBA-TS y DIS-ATS resultaron mucho más eficaces con resultados semejantes al estudio cuantitativo.

La interpretación de los datos se puede mejorar si se describe con mayor certeza las causas más relevantes de variación espectral. Para ello se realizó un Análisis de los Componentes Principales (PCA) sobre el mismo conjunto de datos utilizados anteriormente, en este caso la variabilidad de los scores, representada por las desviaciones estándar, permite detectar el tiempo óptimo de mezclado al alcanzar DE inferiores a la de los scores de una mezcla de referencia. Para este análisis, se aplicó MBSD con una ventana de siete puntos sobre los scores de los tres primeros componentes principales, los cuales describen las características de los tres APIs. La figura 4-16 muestra los resultados obtenidos mediante este método.



**Figura 4-16:** Evaluación de la homogeneidad del mezclado cualitativamente mediante espectroscopía Vis-NIR utilizando MBSD de scores provenientes del PCA aplicado sobre los espectros del proceso.

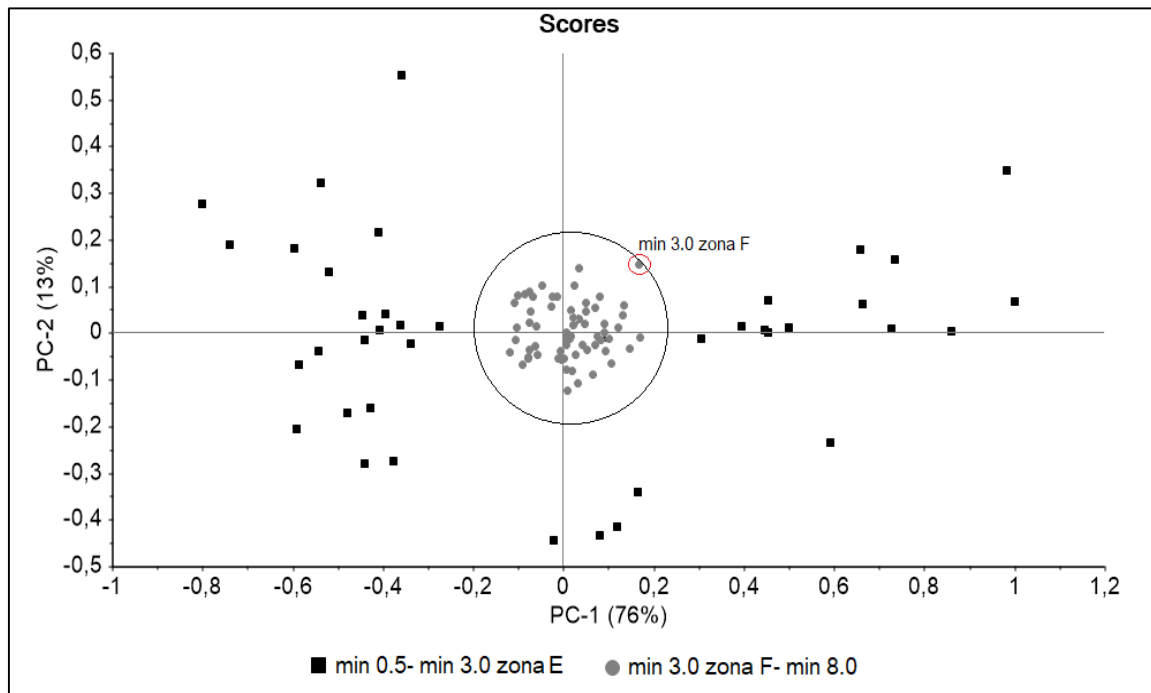


La figura 4-16 representa los valores de DE obtenidos a partir de un bloque de siete puntos para los tres primeros PC a lo largo de todo el proceso de mezclado. Se aprecia que las DE de los scores para los tres PC logran una estabilidad a distintos tiempos. Los Scores del PC1 logran la estabilidad justo antes de los 2.5 minutos y permanecen constantes hasta el final del proceso. Recordemos que el PC1 contiene la información espectral que explica principalmente las características de CAF, la cual, como se demostró en el estudio cuantitativo, logra la homogeneidad antes que los otros dos APIs, explicando la rápida caída en los valores de SD para este PC. Por su parte, tanto los scores del PC2 como los del PC3 logran la estabilidad en algunos muestreos realizados a los 3.0 min, pero es a partir de los muestreos realizado a los 3.5 min en donde la variabilidad de los scores para los tres PCs cae dentro de los límites establecidos.

Otro método utilizado para monitorizar y determinar el punto final del proceso de mezclado utilizando la información proporcionada por el PCA, fue PC Análisis de la distancia de los scores (PC-SDA). Este es un método retrospectivo que tiene una ventaja importante sobre los otros métodos, y es que determina estadísticamente cuál es el punto final de proceso de mezclado con un determinado intervalo de confianza, lo que se traduce en una mayor seguridad para las determinaciones.

El PCA en este caso incorporó los promedios de 5 espectros obtenidos en cada zona muestreada desde el mezclador, dando un total de 112 espectros para el proceso completo, 7 espectros cada 0.5 min por 8.0 min. La determinación del espacio de diseño está relacionado con el valor límite de desviación estándar aceptable para las distancias euclidianas de los scores consecutivos. Si bien el límite estadístico que garantiza un mezclado homogéneo es ambiguo y variable, el autor de la estrategia consideró una DE de distancias euclidianas menor a un 1%, lo que se traduce en la creación de un espacio de diseño con un 95% de confianza. La figura 4-17 muestra el resultado de este análisis, en donde se visualiza la distribución de los scores respecto a los dos primeros PC.

**Figura 4-17:** Distribución espacial de los scores respecto a los dos primeros PC obtenidos al aplicar un PCA sobre los espectros del proceso de mezclado.

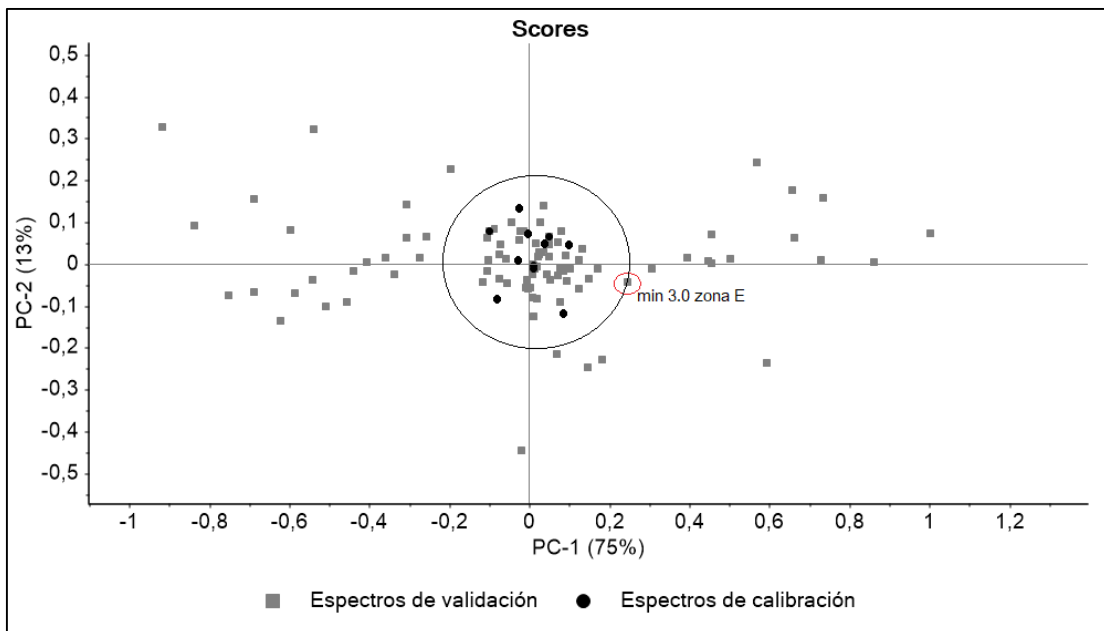


De la gráfica se puede observar que luego de un determinado muestreo (círculo rojo), los scores comienzan a agruparse en el centro de los ejes demostrando en menor grado de variabilidad entre los scores sucesivos. Al ser este un método retrospectivo, las muestras agrupadas en las zonas centrales de la gráfica se consideran como las muestras de calibración, y en su totalidad conforman la zona espacial que determina la homogeneidad del mezclado, de tal forma que cada muestra que se encuentra dentro de la zona delimitada por el círculo negro es considerada como una mezcla sin variabilidad significativa.

Luego, de la misma forma anterior, se realizó un segundo proceso de mezclado de tal manera de predecir el tiempo óptimo con el espacio de diseño determinado. Para ello se realizó un PCA sobre el conjunto de espectros registrados y se incluyó 10 espectros

consecutivos considerados como referencia según lo descrito anteriormente. La figura 4-18 muestra los resultados de este estudio, en donde se puede apreciar que luego del muestreo realizado al minuto 3.0 en la zona E los scores se posicionan dentro del intervalo establecido por las muestras de calibración, demostrando que cumplen con el atributo buena homogeneidad.

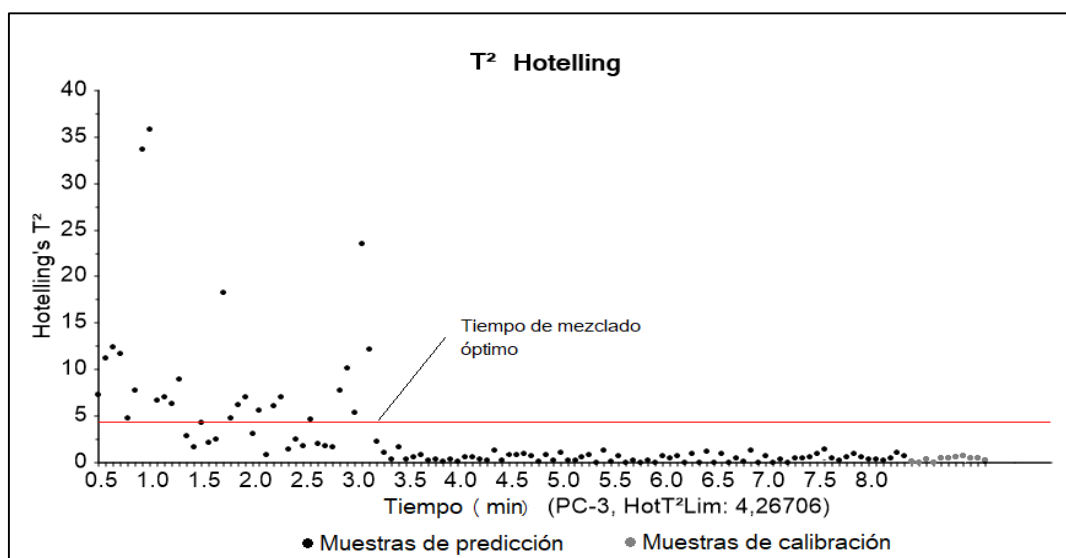
**Figura 4-18:** Distribución espacial de los scores respecto a los dos primeros PC obtenidos al aplicar un PCA sobre los espectros de predicción y 10 espectros de calibración



El análisis de los resultados se puede representar también a través del valor de  $T^2$  Hotelling en función del tiempo (scores). En esta ocasión el punto clave del análisis es determinar el valor de  $T^2$  crit el cual está relacionado con el nivel de confianza respecto a la variabilidad espectral. Por lo tanto el momento en que los scores se encuentran por debajo de este valor crítico es considerado como el tiempo necesario para lograr un mezclado homogéneo.

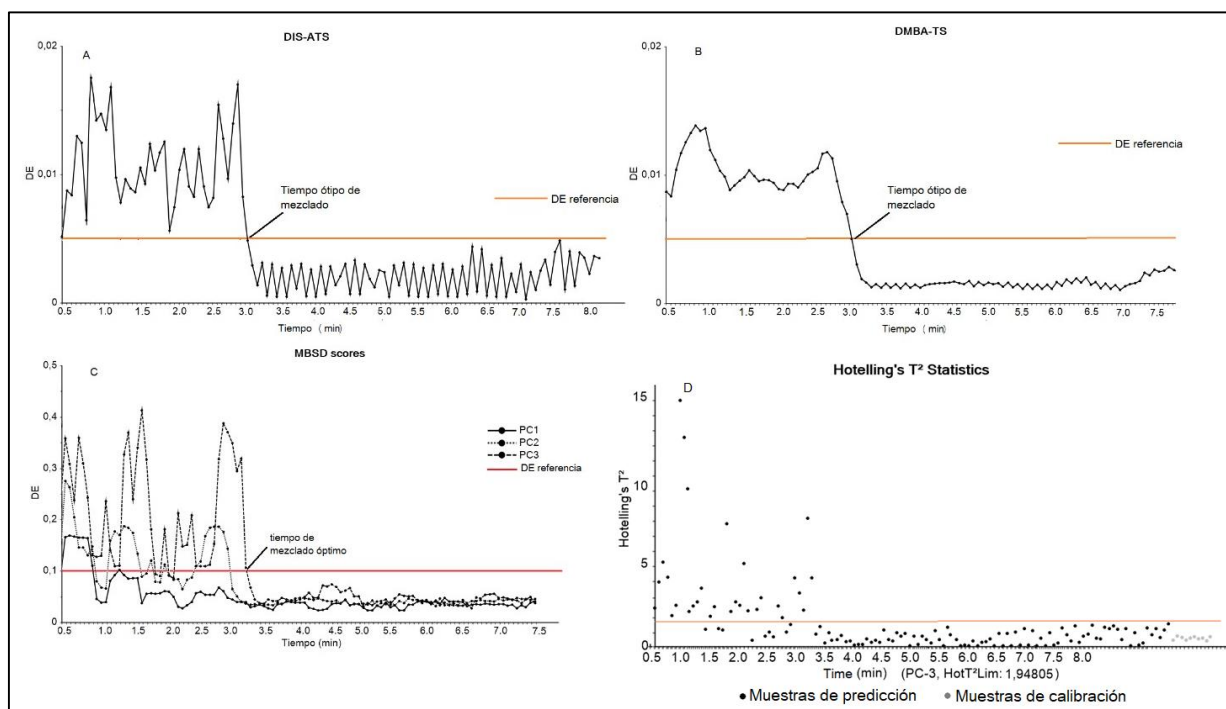
La figura 4-19 ilustra los gráficos de  $T^2$  Hotelling predichos para el proceso de homogeneización del mezclado. Se aprecia que el tiempo en que los scores caen bajo el valor de  $T^2$  crit es a partir de los últimos muestreos realizados en el min 3.0, lo que es coincidente con los resultados obtenidos anteriormente. Sin embargo, a pesar de obtener resultados comparables a la metodología cuantitativa (esencialmente más confiable), no fue posible establecer un el intervalo de confiabilidad semejante al reportado por autor de la estrategia (95%). En nuestro caso, los espectros considerados como de referencia permitieron determinar desviaciones estándar de distancias euclidianas que representan una confianza estadística de un **85%**. Esto se debe a que al alto ruido proveniente de la técnica instrumental no son eliminados por el pretratamiento espectral, y opaca las señales propias de cada componente afectando la sensibilidad de los registros, lo que se ve traducido en un aumento del error analítico.

**Figura 4-19:** Evaluación de la homogeneidad del mezclado cualitativamente mediante espectroscopía Vis-NIR utilizando el grafico Hotelling's  $T^2$



**b) Registros desde el mezclador:** Con el objetivo de disminuir el error analítico que arrastran las extracciones de la muestra, se utilizó una estrategia de muestreo que consistió en registrar espectros desde el interior del mezclador en 7 zonas específicas. El análisis se realizó sobre 112 espectros en donde se registraron 7 espectros en intervalos de 0.5 min. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 4-20, en donde se muestra los análisis estadísticos aplicados para la detección del mezclado homogéneo. Las gráficas entregan resultados similares a los obtenidos mediante el muestreo segregado, siendo DIS-ATS, DMBA-TS y el análisis de las DE de scores continuos los que permitieron obtener información interpretable respecto a la uniformidad de la mezcla, la cual se logró a los 3.5 min. Sin embargo, al someter los espectros a un estudio mediante PC-SDA, se observó una ventaja adicional respecto al muestreo segregado. El registro espectral dentro del mezclador permitió disminuir considerablemente el ruido espectral entre cada registro, lo que se tradujo en la creación de un espacio de diseño con una confiabilidad de un 90%, otorgándole un gran sustento estadístico a la metodología. El resultado de este estudio se aprecia en la figura 4-20D a través de la representación gráfica del valor  $T^2$  Hotelling calculado con un 90% de confianza.

**Figura 4-20:** Evaluación de la homogeneidad del mezclado cualitativamente mediante espectroscopía Vis-NIR utilizando (A) DIS-ATS, (B) DMBA-TS y (C) MBSD de scores.



Este aumento de la reproducibilidad de los registros es el resultado de la disminución del error que incorpora cada extracción del incremento, el cual fue descrito en la sección 1.6. Por lo que el muestreo desde el interior es una alternativa de mayor confiabilidad respecto al muestreo segregado para este tipo de análisis.

**c) Análisis continuo:** Una tercera estrategia incluida en este trabajo para analizar un proceso de mezclado, fue a través de un análisis continuo con registros espectrales desde fuera del mezclador. Esta estrategia se acerca en gran medida a los actuales mecanismos tecnológicos utilizados en la academia y algunos laboratorios farmacéuticos para la investigación y el control de procesos. Para ello se montó un sistema de análisis sencillo a escala piloto descrito en la sección 4.2.4.1 (figura 4-4), en donde el registro espectral se realizó en un mismo punto cada 2 segundos durante todo el proceso (8 minutos). Al

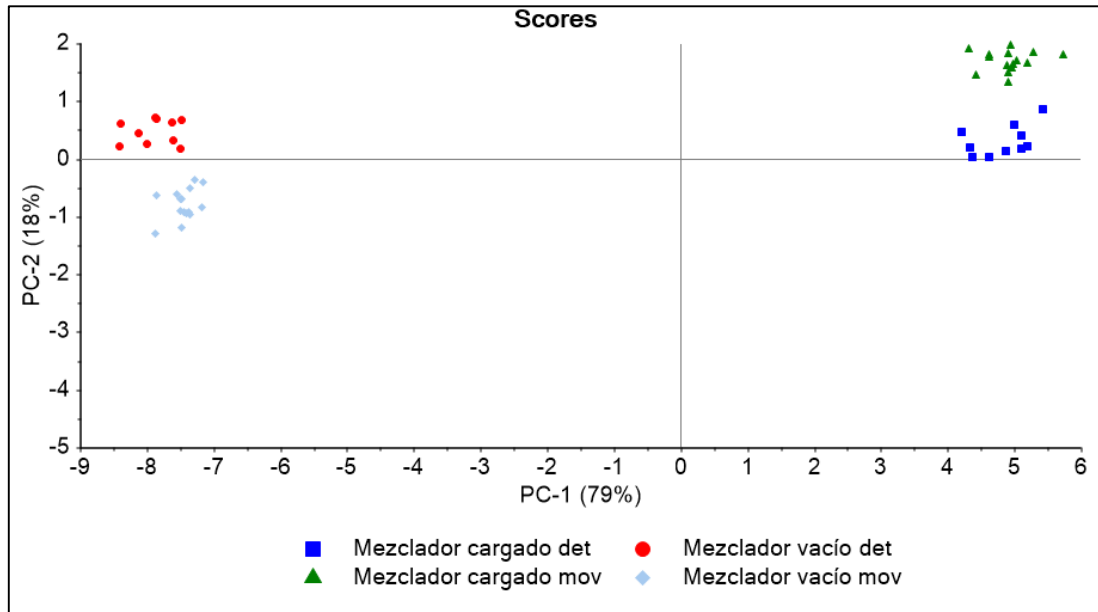
registrar los espectros a través del recipiente del mezclador, se corre el riesgo que señales espectrales provenientes del recipiente del mezclado interfieran en el estudio, por lo que previo al análisis estadístico fue necesario corregir estas señales de interferencias en la medida de poder garantizar que la información recopilada corresponde únicamente a la porción del mezclado que se analizó. Para lograr esta corrección, se montó el sistema de análisis continuo y se registró un conjunto de 10 espectros consecutivos en un mismo punto del mezclador el cual se encontraba vacío (sin mezcla) y detenido. Luego, este procedimiento se repitió pero registrando los espectros de manera continua en el mismo punto cada 4 segundos por 1 minuto pero con el mezclador rotando a 30 RPM. Posterior a ello, se incorporó dentro del mezclador 50 g de una mezcla considerada homogénea, y nuevamente se le realizó el registro espectral a la misma zona del recipiente pero esta vez con mezcla. Finalmente, para obtener un registro espectral de la mezcla homogénea en movimiento, se registró el espectro cada 4 segundos por un minuto al mismo punto establecido, pero esta vez simulando el proceso de mezclado a 30 RPM con una mezcla previamente homogeneizada. En resumen, se obtuvieron 4 conjuntos de espectros obtenidos en el mismo punto del mezclador, los cuales se conformaron por 10 espectros provenientes del mezclador vacío detenido, 10 espectros con el mezclador cargado detenido, 15 espectros con el mezclador cargado detenido y 15 espectros con el mezclador vacío en movimiento.

El análisis de los conjuntos de datos espectrales incluyó un pretratamiento espectral que consistió en una corrección de línea base seguido de una SNV y posterior a ello un estudio mediante un PCA. La figura 4-21 muestra el resultado de este análisis. Se observa un claro



agrupamiento de cada conjunto de datos explicado en gran medida por los dos primeros PCs con un 97% de la varianza descrita. La distribución de los scores en el eje x (PC1) muestra una evidente segregación de los espectros obtenidos con el mezclador cargado tanto detenido como en movimiento, agrupados en el extremo de valores positivos, respecto al grupo de espectros obtenidos con mezclador vacío, los cuales se agrupan en el extremo de contribución negativa. Esto hace suponer que el primer PC (79% de varianza explicada) contiene la información espectral que propicia el recipiente del mezclador siendo el llenado con muestra el principal factor diferenciador que describe el agrupamiento de estas muestras. Esta aseveración toma aún más validez al observar la distribución de los scores en función del PC2 (18% de varianza explicada). En este PC, los scores que representan los espectros del mezclador detenido, tanto cargado como vacío, adquirieron valores similares, lo que indica la presencia de similitudes físicas entre ambos grupos aludidas a la ausencia de movimiento cuando se registraron los espectros. Por su parte, los scores que representan los registros del mezclador en movimiento (cargado y vacío) adquirieron valores que ayudaron a diferenciarlos de los registros detenidos, lo que hace suponer que el PC2 contiene la información que involucra la toma de registros continuos.

**Figura 4-21:** Distribución espacial de los scores en relación al PC1 y PC2 obtenidos del PCA aplicado sobre el conjunto de datos espectrales adquiridos desde el exterior del mezclador



Considerando los resultados obtenidos, para eliminar efecto producido por el registro espectral desde el exterior del mezclador, se promediaron los espectros del mezclador vacío en movimiento y se determinó un factor de corrección en función al error relativo de las intensidades cada longitud de onda respecto a los espectros adquiridos con el mezclador cargado en movimiento, según se muestra en la Ecuación 4-3.

$$F_{\lambda=i} = \frac{A_i^{m.v} - A_i^{m.c}}{A_i^{m.c}} \quad \text{Ecuación 4-3}$$

donde  $A_i^{m.v}$  es la absorbancia a una determinada longitud de onda proveniente del promedio de espectros obtenidos desde el mezclador vacío en movimiento, y  $A_i^{m.c}$  es la absorbancia a la misma longitud de onda pero proveniente del promedio de espectros obtenidos desde el mezclador cargado en movimiento.

Cada factor determinado se multiplicó sobre las intensidades a la respectiva longitud de onda en los espectros adquiridos para el estudio del proceso de mezclado. El cálculo del factor de corrección se realizó por quintuplicado, es decir, a través de 5 mezclas distintas consideradas homogéneas. Luego se calculó un promedio sobre los factores obtenidos a cada longitud de onda ( $\bar{F}$ ), y se aplicó un test estadístico comparativo a los 5 factores promediados. La tabla 4-3 muestra los resultados del análisis estadístico realizado sobre el promedio de los factores determinados. Se observa que no existen diferencias significativas entre los factores calculados, por lo que el factor de corrección a cada longitud de onda se calculó a partir del promedio de los factores obtenidos en los 5 experimentos, los cuales sirvieron para corregir el efecto del recipiente del mezclador

**Tabla 4-3:** Análisis estadístico para el promedio de factores ( $\bar{F}$ ) a cada longitud de onda obtenido a partir de 5 experimentos

Experimento	$\bar{F}$	$\bar{x}-\bar{F}$
1	-0,1321	-0,00192
2	-0,1298	-0,00422
3	-0,1328	-0,00122
4	-0,1381	0,00408
5	-0,1373	0,00328
$\bar{x}$	-0,13402	
$\sigma$	0,003549	
Nivel de confianza (95%)		0,004406945

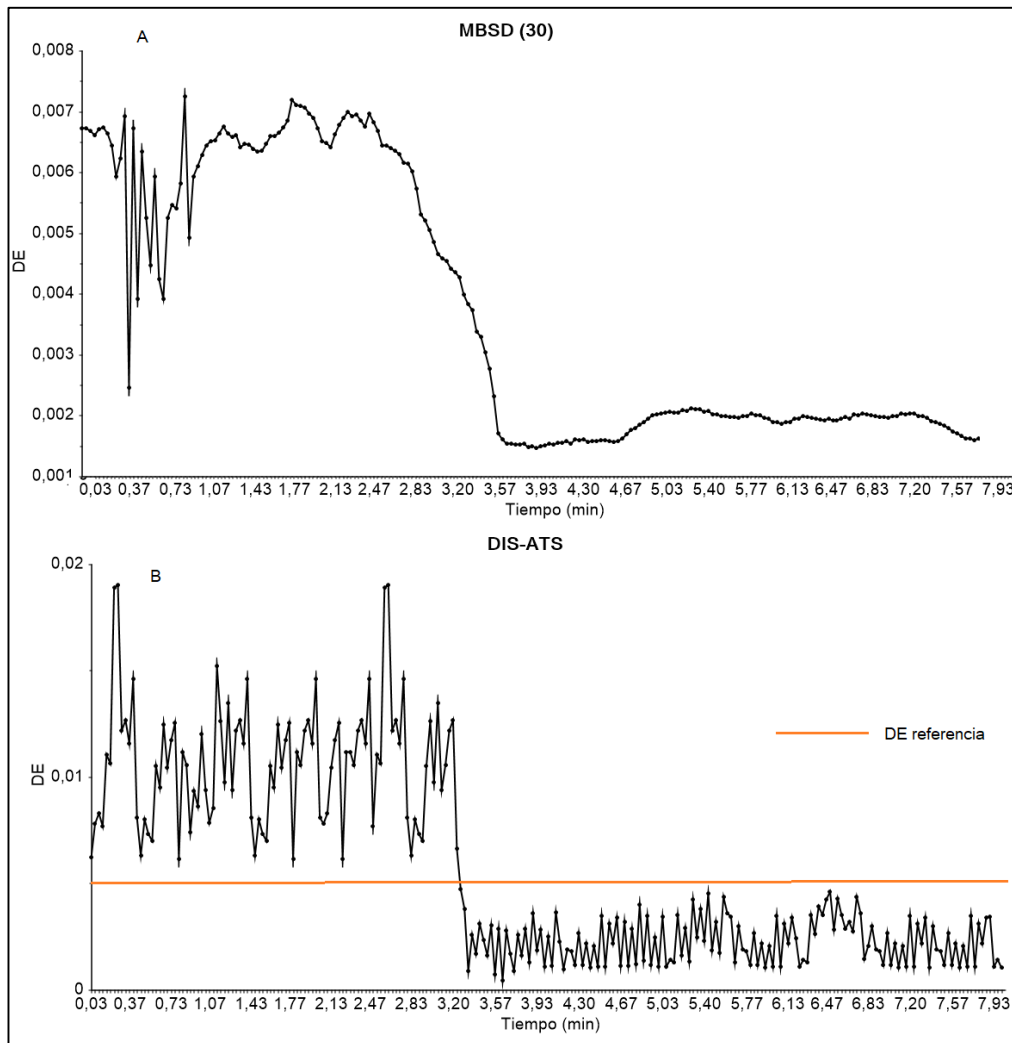
A partir del estudio mediante un análisis continuo se lograron registrar 240 espectros a lo largo de todo el proceso. A cada espectro se le aplicó el factor de corrección determinado

y se analizaron a través de las estrategias estadísticas descritas para detectar el tiempo de mezclado óptimo.

Los resultados de este estudio se resumen en las figuras 4-22 y 4-23. De los métodos cualitativos evaluados solamente DIS no entregó resultados interpretables, en donde las DE de las diferencias espectrales entre espectros consecutivos no lograron una estabilización durante el tiempo que duró el proceso. Sin embargo, a diferencia de las otras dos estrategias (muestreo segregado y registros desde el interior del mezclador) la estrategia de MBSD (figura 4-22A) permitió detectar un tiempo en el que las desviaciones estándar se hacen constantes indicando una homogeneidad de la mezcla, la cual se logra aproximadamente a los 3.57 min. El mismo resultado se obtuvo para el análisis mediante DIS-ATS en donde las DE de las diferencias espectrales frente a un espectro de referencia alcanzaron valores por debajo del establecido a los 3.20 min. En esta ocasión, la DE considerada como de referencia para la detección del mezclado óptimo se obtuvo a partir de la DE de las intensidades del promedios de los 5 espectros analizados (previamente corregidos).

Mediante el análisis continuo se logró registrar una mayor cantidad de espectros por minuto en relación a los análisis discontinuos, esto permitió incluir un número de espectros considerables (30 espectros) en la ventana móvil destinada a calcular desviación estándar, lo que se tradujo en una mayor capacidad de la estrategia MBSD para detectar las diferencias espectrales y así determinar el tiempo óptimo de la mezcla de una manera más específica, pero sin un sustento estadístico determinante.

**Figura 4-22:** Monitorización del proceso de mezclador mediante MBSD (A) y DIS-ATS (B).

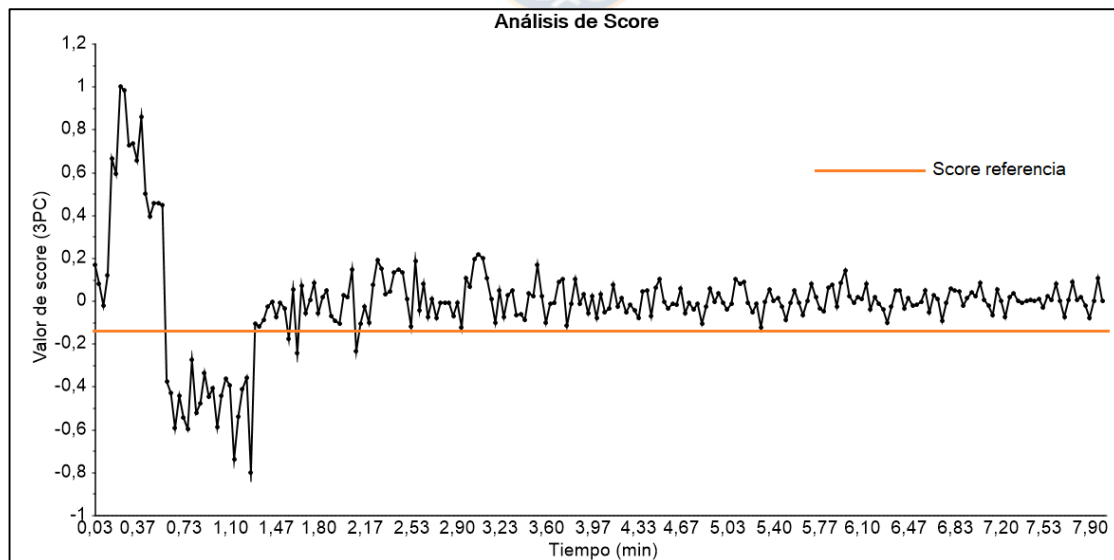


De manera similar, se estudió la homogeneidad el mezclado mediante el análisis de los scores provenientes de la aplicación de un PCA sobre todos espectros del proceso (420 espectros). Los resultados de esta evaluación se muestran en la figura 4-23. La figura muestra la variación de los scores en función del tiempo frente a un valor de score de referencia el cual representa el espectro de una mezcla homogénea. Se aprecia que después de un determinado tiempo, el valor de los scores no alcanzaron una cercanía suficiente al de referencia, indicando que el mezclado no alcanzó la homogeneidad según

los criterios establecidos. De igual manera, al someter los espectros a un análisis mediante PC-SDA, las muestras no alcanzaron el valor de  $T^2$  Hotelling crit para un intervalo de confianza de 70%, lo que hace suponer que el análisis de los scores es una estrategia inadecuada para el objetivo en las condiciones estudiadas. Al ser el PCA un algoritmo que detecta las principales variaciones de un conjunto de datos, la reproducibilidad de los espectros es un factor indispensable para lograr extraer la información de relevancia analítica. El análisis continuo, si bien permitió registrar una mayor cantidad de espectros para el análisis, la reproducibilidad de la toma de espectros se vio afectada en gran medida, debido a la inclusión de información espectral ruidosa que no fue posible remover mediante el factor de corrección ni tampoco con el pretratamiento espectral aplicado.



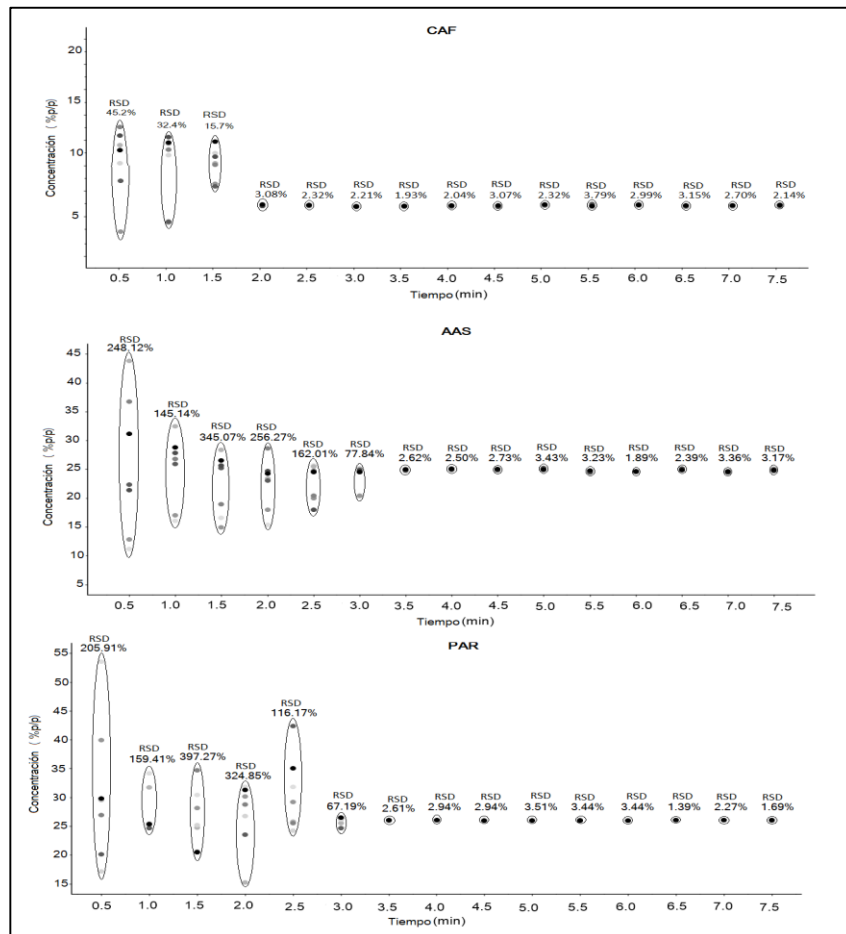
**Figura 4-23:** Monitorización del proceso de mezclador mediante el análisis de score respecto a una referencia.



### 4.3.3.3. DETERMINACIÓN MEDIANTE METODOLOGÍA DE REFERENCIA

Como ensayo final, se monitorió el tiempo de mezclado mediante la metodología utilizada por la industria farmacéutica para validar el proceso. Los resultados de este análisis se representan gráficamente en la figura 4-24. Se puede observar que los resultados se asemejan considerablemente a los obtenidos mediante el modelo PLS desarrollado. El mezclado óptimo se logra a los 3.5 minutos con valores de RSD inferiores al 3%. Al igual que lo determinado mediante las técnicas espectroscópicas, cafeína fue el API que alcanzó la homogeneidad antes que el resto de los componentes debido a las características físicas que la diferencian.

**Figura 4-24:** Monitorización del proceso de mezclador mediante la metodología de referencia



#### 4.4. CONCLUSIONES

Resumiendo la información recopilada al evaluar las distintas estrategias para monitorizar el proceso de mezclado, se puede concluir que el modelo PLS utilizado para el análisis cuantitativo es una metodología confiable con parámetros analíticos comparables a las metodologías de referencia HPLC pero sin la necesidad de realizar algún tratamiento a la muestra lo que reduce el error analítico que otorga esa etapa. Además, a diferencia de los métodos cualitativos, estos análisis brindan datos precisos y basados en la concentración del API durante todo el proceso de mezclado. Sin embargo son más laboriosos, complicados y requiere personal altamente calificado para su preparación, pero no para su ejecución.

Por su parte, como es sabido, los métodos cualitativos son simples, fáciles de aplicar (no requieren personal calificado) y con resultados adecuados al objetivo de estudio. En cuanto a la técnica para el registro espectral, se obtuvieron resultados variables. Por un lado, para el análisis discontinuo, se evidenció el error analítico que se incorpora en las mediciones al realizar un muestreo segregado, frente a la toma de registros desde el interior del mezclador, en donde el análisis mediante PC-SDA permitió detectar el tiempo de mezclado óptimo como mayor respaldo estadístico para la segunda estrategia que para el muestreo segregado, siendo esta la más utilizada por la industria farmacéutica para los análisis. Sin embargo, la toma de registros discontinuos imposibilita la obtención de un número de datos apropiados que le den sustentabilidad a la estrategia para hacerla más exacta y confiable. En ese sentido, el análisis continuo presentó la ventaja de entregar tiempos de mezclados más exactos, debido al número



mayor de espectros registrados por minuto (30 espec/ min), lo que permitió monitorizar el proceso mediante la estrategia de MBSD. No obstante, se vio afectada la reproducibilidad de las mediciones, debido a que la configuración del sistema tecnológico utilizado para el registro espectral de manera continua no fue lo suficientemente robusto para garantizar la correcta interpretación de los datos mediante el análisis de los scores, en donde la variabilidad propia del proceso enmascaró las características químicas y físicas de los componentes mezclados. Si bien los estudios realizados de manera continua no entregaron un sustento estadístico solvente para considerarla como una estrategia de primera elección, pequeñas mejoras en cuanto a la automatización del registro espectral posibilitarían esta opción, sobre todo considerando el costo que conlleva la implementación de técnicas espectroscópicas NIR para el análisis en línea.



#### **4.5. REFERENCIAS**

- 1) *Bozzone, S. (2001, May). Solid Oral Dosage Forms Powder Blending. In IKEV Meeting presentation.*
- 2) *Hailey, P. A., Doherty, P., Tapsell, P., Oliver, T., & Aldridge, P. K. (1996). Automated system for the on-line monitoring of powder blending processes using near-infrared spectroscopy part I. System development and control. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 14(5), 551-559.*
- 3) *Sekulic, S. S., Ward, H. W., Brannegan, D. R., Stanley, E. D., Evans, C. L., Sciavolino, S. T. & Aldridge, P. K. (1996). On-line monitoring of powder blend homogeneity by near-infrared spectroscopy. Analytical Chemistry, 68(3), 509-513.*

4) Sekulic, S. S., Wakeman, J., Doherty, P., & Hailey, P. A. (1998). Automated system for the on-line monitoring of powder blending processes using near-infrared spectroscopy: Part II. Qualitative approaches to blend evaluation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 17(8), 1285-1309.

5) De Maesschalck, R., Sánchez, F. C., Massart, D. L., Doherty, P., & Hailey, P. (1998). On-line monitoring of powder blending with near-infrared spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 52(5), 725-731.

6) Blanco, M., Bano, R. G., & Bertran, E. (2002). Monitoring powder blending in pharmaceutical processes by use of near infrared spectroscopy. *Talanta*, 56(1), 203-212.

7) Puchert, T., Holzhauer, C. V., Menezes, J. C., Lochmann, D., & Reich, G. (2011). A new PAT/QbD approach for the determination of blend homogeneity: combination of on-line NIRS analysis with PC Scores Distance Analysis (PC-SDA). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(1), 173-182.

8) Claßen, J., Aupert, F., Reardon, K. F., Solle, D., & Scheper, T. (2017). Spectroscopic sensors for in-line bioprocess monitoring in research and pharmaceutical industrial application. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 409(3), 651-666.

9) Ignat, T., Schmilovitch, Z., Fefoldi, J., Steiner, B., & Alkalai-Tuvia, S. (2012). Non-destructive measurement of ascorbic acid content in bell peppers by VIS-NIR and SWIR spectrometry. *Postharvest biology and technology*, 74, 91-99.

## CAPITULO V

# **5. USO DE ESPECTROSCOPIA NIR Y RAMAN PARA LA CUANTIFICACION DE PRINCIPIOS ACTIVOS EN COMPRIMIDOS FARMACÉUTICOS TERMINADOS**



## **5.1. INTRODUCCIÓN**

El análisis cuantitativo de los principios activos en comprimidos terminados es una práctica común y muy demanda dentro de los laboratorios farmacéuticos, tanto para análisis obligatorios como para análisis de rutina (principalmente en lo que confiere a revalidación de metodologías analíticas). Esta parte del estudio contempló el desarrollo de metodologías cuantitativas mediante espectroscopía NIR y Raman que cumplan con los requisitos mínimos para llevar a cabo el ensayo de uniformidad de dosis en una formulación farmacéutica sólida comercial.

## **5.2. EXPERIMENTAL**

### **5.2.1. DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS**

Dolider es un medicamento comercializado en Chile, desarrollado y distribuido por Laboratorios Pasteur S.A y utilizado para aliviar el dolor de cabeza.

La composición de cada comprimido de Dolider incluye paracetamol en 250 mg (26.3 %), ácido acetilsalicílico en 250 mg (26.3 %) y cafeína en 65 mg (6.8 %) como ingredientes activos. Además, contiene tres excipientes (lactosa, almidón y celulosa microcristalina) que en su totalidad representan el 40.6 % del producto total. Cada tableta comercial pesa aproximadamente 950 mg, tiene una forma ovalada con una longitud de 2 cm y un ancho de 0.5 cm en la zona media.

Todas las materias primas necesarias para la confección de las muestras fueron proporcionadas por el laboratorio farmacéutico.

### **5.2.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE CALIBRACIÓN**

La construcción de un conjunto de calibración es un paso crítico para obtener resultados de predicciones de calidad; el set de calibración se preparó en base a un modelo de diseño D-Optimal con cinco niveles de concentraciones para cada API entre 80 y 120 %, siendo 100% el valor nominal de producto. Para lograr estos niveles de concentración, se utilizó la estrategia de sobre e infradosificación de muestras comerciales previamente molidas. Además, para incluir la variabilidad proveniente de los excipientes, se prepararon tres mezclas variando entre un 90 % y un 110 % la concentraciones de los tres componentes respecto al su valor nominal. Así se formuló la matriz de excipientes 1 con las concentraciones nominales de cada componente, la matriz de excipientes 2 con concentraciones de un 90 %, y la matriz de excipientes 3 con concentraciones de un 110 % de cada componente. Cada una de estas mezclas fue utilizada para cubrir un tercio de las muestras de calibración y así lograr las concentraciones de API deseadas (1). Finalmente se formularon 36 mezclas de calibración las cuales se compactaron a 140 MPa en una prensa Perkin Elmer 15.001 (Waltham, MA, EE. UU.). Cada tableta hecha en el laboratorio (lab-tablet) pesó en promedio 310 mg con un diámetro de 1 cm. Además, para adicionar variabilidades físicas provenientes de la planta de producción, se evaluó la inclusión de espectros de muestras comerciales en el conjunto de calibración y así obtener predicciones más exactas.

### **5.2.3. PREPARACION DE LAS MUESTRAS DE VALIDACIÓN**

El conjunto de validación consistió en 33 tabletas, 13 de ellas confeccionadas en el laboratorio con concentraciones de ingredientes activos dentro del intervalo

comprendido por el set de calibración, y 20 tabletas comerciales. Las 13 muestras hechas en el laboratorio se compactaron en las mismas condiciones que el conjunto de calibración. Las mismas muestras calibraciones y validación se utilizaron tanto para los análisis realizados con NIR como para realizados con Raman.

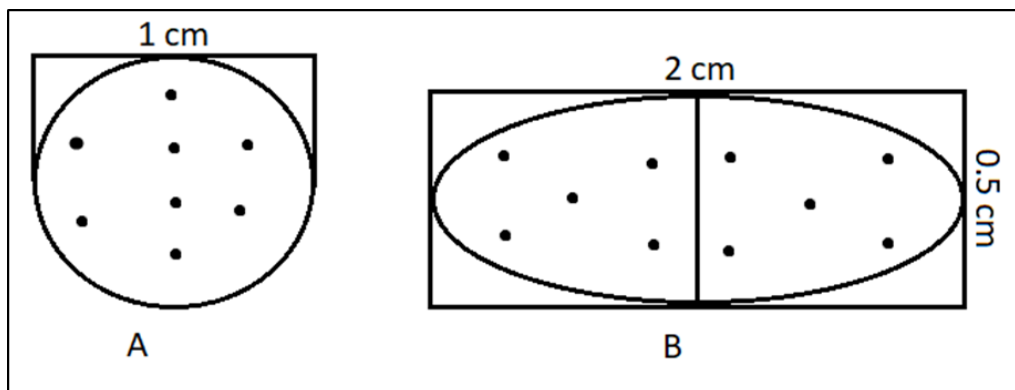
#### **5.2.4. REGISTRO ESPECTRAL**

Para las mediciones realizadas con NIR, el registro espectral se realizó por triplicado, en donde se rotó la tableta cada vez que se adquirió un espectro.

En la adquisición de espectros Raman, como primer paso, se colocó la muestra en la plataforma xyz y se ajustó la altura (eje z) para maximizar la intensidad de la señal. En los registros Raman, la muestra es irradiada con un láser de tamaño de spot de 100 micras, por lo que para aumentar la representatividad del conjunto de espectral se registraron los espectros en diferentes posiciones de la muestra siguiendo una cuadrícula prefijada como se muestra en la (Figura 5-1). En el caso de las muestras hechas en laboratorio los registros se realizaron en 8 puntos distintos, mientras que para las muestras comerciales se realizó en 10.

Para evitar un posible efecto sistemático debido a las variaciones instrumentales del día a día, los espectros adquiridos tanto para el conjunto de calibración como para el conjunto de validación se registraron siguiendo un esquema aleatorio y en 5 días diferentes.

**Figura 5-1:** Esquema de la adquisición espectral Raman para A) Lab-tablet y B) muestra comercial.



### 5.2.5. ANÁLISIS DE DATOS Y DESARROLLO DE MODELOS QUIMIOMÉTRICOS.

Tanto para los modelos cuantitativos NIR como para los Raman se utilizó una regresión parcial de mínimos cuadrados (PLS) mediante validación cruzada completa leave-one-out (LOO) como algoritmo quimiométrico. Se desarrollaron y evaluaron varios modelos de cuantificación, siendo los pretratamientos espectrales y el intervalo de trabajo los principales factores a evaluar. Un preprocesamiento espectral adecuado reduce el efecto de las fuentes no deseadas de variación causadas por las propiedades físicas de las muestras. En el caso de NIR los pretratamientos más utilizados son el SNV y las derivadas. SNV corrige el efecto de dispersión lumínica, mientras que la segunda derivada (2D) corrige el desplazamiento y las desviaciones lineales de la línea base, reduciendo la colinealidad de los espectros. En los casos que se utilizaron derivadas éstas se ajustaron a un polinomio de segundo orden con ventana móvil de 15 puntos.

Para la espectroscopía Raman se utilizaron tratamientos espectrales destinados a reducir la variabilidad de la intensidad generadas por el láser, para ello la Normalización de los picos junto con una corrección de línea base son los pretratamientos espectrales que mejores resultados demuestran. El mejor modelo se seleccionó con base en criterios convencionales como, coeficiente de determinación ( $R^2$ ), error de la raíz cuadrática media de los valores de calibración (RMSEC) y error de la raíz cuadrática media de los valores de las predicciones (RMSEP).

El paquete de software Unscrambler X 10.3 (Trondheim, Noruega) se usó para pretratar y construir los modelos de calibración. Este software incorpora pretratamientos espectrales (SNV, normalizaciones, promediado, derivadas o suavizados) y herramientas quimiométricas como PCA o PLS.

#### **5.2.6. EXACTITUD Y PRECISIÓN DE LA METODOLOGÍA.**

Una vez obtenido el modelo de calibración más apropiado, es necesario determinar la exactitud y precisión de cada API de acuerdo con las pautas de ICH (2), y así garantizar predicciones confiables.

La precisión de las metodologías desarrolladas se evaluó en función de la repetibilidad y precisión intermedia. Para la metodología NIR, se estudió la repetibilidad midiendo una tableta 10 veces consecutivas, quitando y reemplazando la muestra cada vez que se realizó el registro. Para la metodología Raman se estudió la repetibilidad removiendo la tableta de la placa de muestreo, desenfocando y repitiendo el procedimiento de medición 10 veces también. Para ambas técnicas, la precisión intermedia se estimó registrando el espectro de la misma tableta en 7 días diferentes, los resultados se



expresan como el porcentaje de la desviación estándar relativa (% RSD).

La exactitud se evaluó para ambas metodologías mediante el error relativo de las predicciones de conjunto de validaciones externas. Los requisitos de la industria farmacéutica establecen que los límites de error deben estar entre 5 y 10% dependiendo la concentración y la naturaleza del API (3), para este estudio, el riesgo máximo para obtener resultados aceptables fue de un error relativo inferior al 5%.

#### **5.2.7. MÉTODO DE REFERENCIA**

Para comprobar que los resultados predictivos con la metodología desarrollada corresponden a valores reales de concentración, cada muestra hecha en el laboratorio y cada muestra comercial, se analizó mediante una metodología HPLC de referencia validado por el laboratorio farmacéutico. Previo al análisis cromatográfico se hizo un tratamiento de muestra en donde la tableta se trituró y se transfirió a un matraces volumétricos de 25 mL y 100 mL para las muestras hechas en laboratorio y para las muestras comerciales respectivamente. Luego se añadió la mitad del volumen del matraz con disolvente, se sonicó durante 30 minutos y se agitó mecánicamente durante otros 30 minutos. El volumen del matraz se completó con solvente y se dejó reposar durante 5 minutos. Se tomó una alícuota de 1 mL y se llevó a un matraz graduado de 10 mL. Finalmente, se preparó un filtrado de 0.25 micras para su posterior inyección en el cromatógrafo. Las condiciones cromatográficas para el análisis se detallan en la tabla 4-1.

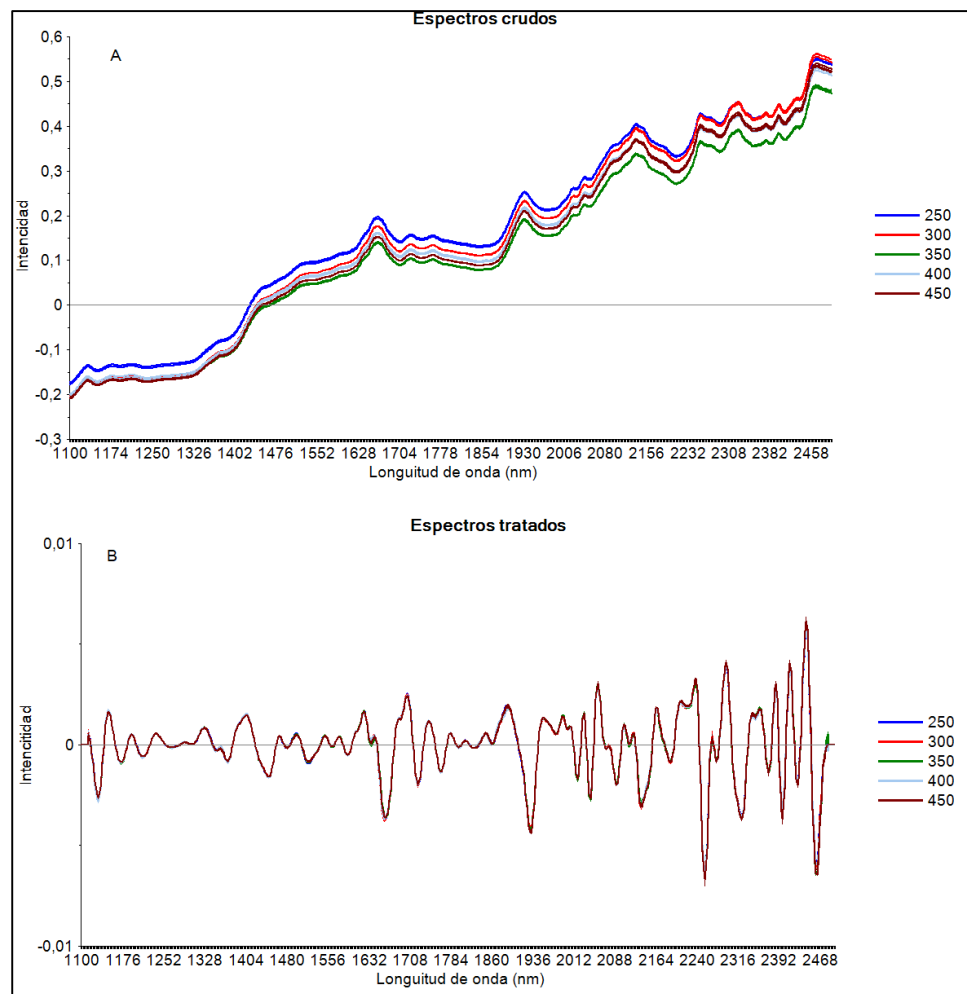
### **5.3. RESULTADOS**

#### **5.3.1. ESTUDIOS PRELIMINARES**

##### *5.3.1.1. MASA PARA LA FABRICACIÓN DE COMPRIMIDOS*

Como se mencionó en el capítulo anterior, la construcción de los set de calibración y validación contempló muestras comerciales y muestras confeccionadas en el laboratorio a distintas concentraciones (lab-made). Los comprimidos hechos en el laboratorio fueron compactados a 140 MPa por medio de punzones de forma circular, cuyo compartimento de compresión permitía adicionar distintas cantidades de polvo que iban de entre 100 mg a 500 mg. La cantidad de muestra compactada determinará el grosor de la tableta confeccionada. Este parámetro cobra relevancia debido a que los registros espectrales se realizan en modo reflectancia difusa, por lo que es necesario confeccionar tabletas que permitan una interacción entre las partículas con el haz de luz de forma representativa y con la precaución de que este no atraviese la muestra. Para ello, se pulverizaron 10 muestras comerciales las que fueron utilizadas para confeccionar comprimidos de 250, 300, 350 y 400 mg con distintos grosores. Luego se realizó un registro espectral por triplicado a cada comprimido y se evaluó la cantidad de masa óptima requerida para su confección. La figura 5-2 muestra los registros de los espectros brutos y tratados con SNV seguido de una segunda derivada de los comprimidos con distinto grosor.

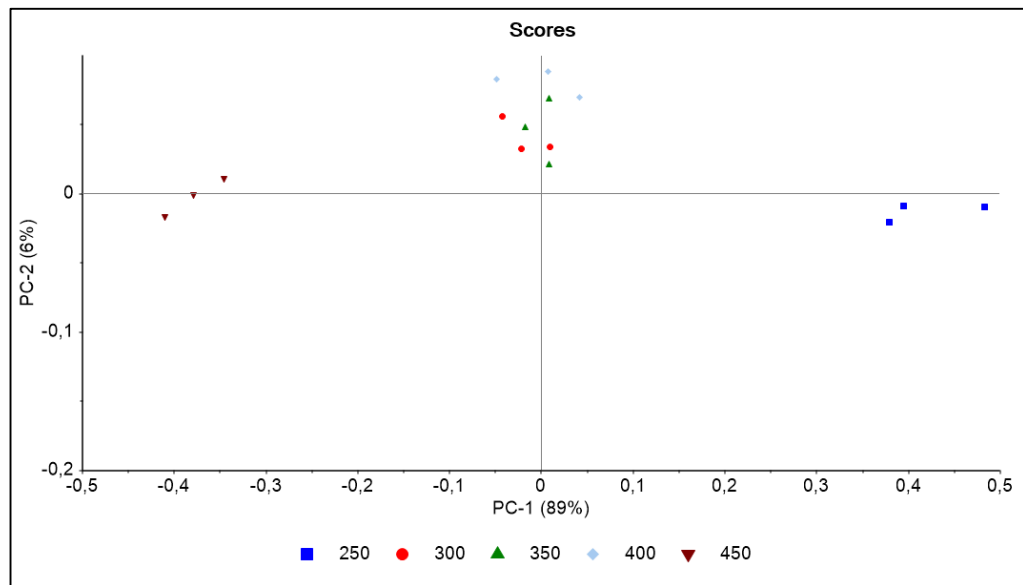
**Figura 5-2:** Representación de los espectros A) crudos y B) tratados mediante SNV seguido de una 2D de 15 puntos, proveniente de tabletas confeccionadas en el laboratorio con distinta masa y grosor.



Luego de tratar los espectros brutos mediante los algoritmos mencionados, fue difícil determinar visualmente si existen diferencias entre cada uno de los comprimidos, por lo que se le aplicó un PCA al conjunto de espectros y se analizó la distribución de los scores frente a los dos primeros PC. Esta distribución está representada en la figura 5-3,

donde es posible observar con mayor claridad las diferencias entre los cuatro comprimidos. Queda en claro manifiesto las diferencias espectrales de los comprimidos de 250 mg y 450 mg, agrupados en los extremos del PC1, relación a los de 300, 350 y 400 mg, agrupados en el centro de la gráfica. Esto indica que las cantidades entre 300 y 400 mg permiten obtener registros reproducibles sin estar entorpecidos por el recorrido que realiza el haz debido al grosor de la muestra, finalmente 350 mg fue la cantidad seleccionada para la confección de los comprimidos.

**Figura 5-3:** Gráfica bidimensional de la distribución de los scores en relación al PC1 y PC2 del PCA realizado sobre las tabletas de distinta masa y grosor.

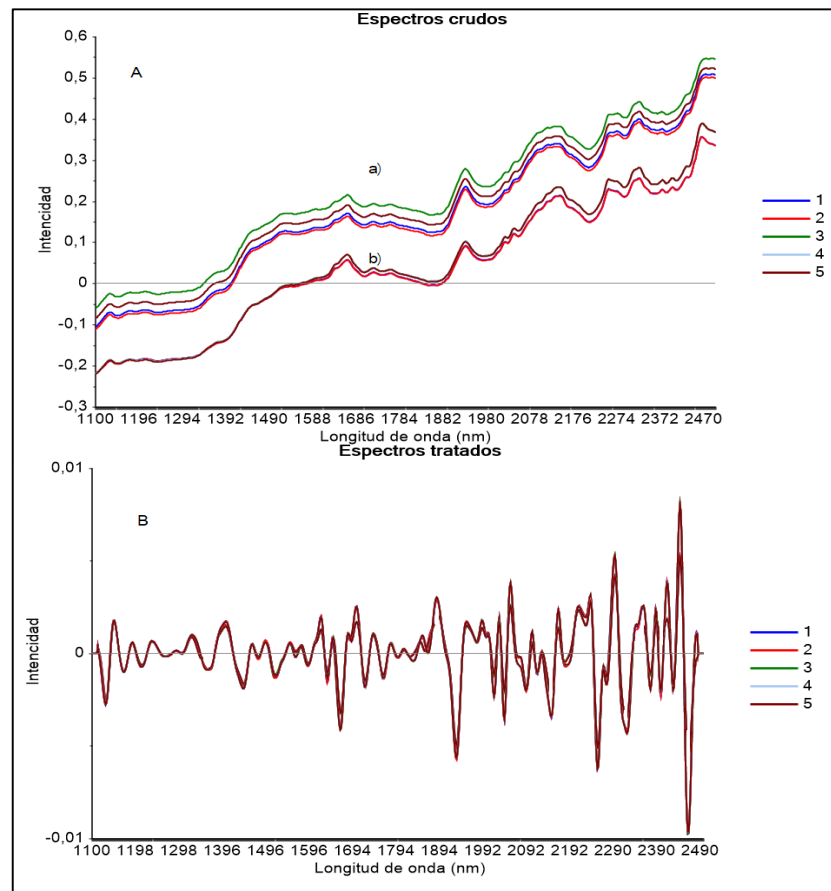


### 5.3.1.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO ESPECTRAL

Para evaluar la capacidad de los distintos pretratamientos para eliminar las diferencias espectrales debidas a la presentación física de la muestra (las diferencias de scattering), se les registró el espectro a cinco muestras comerciales. Luego, estas muestras se pulverizaron y se compactaron 350 mg del polvo triturado para nuevamente registrar su espectro.

En la figura 5-3A se muestran los espectros crudos de comprimidos comerciales (a) y los espectros crudos de comprimidos compactados en el laboratorio (b), mientras que la figura 5-4B muestra los mismos espectros tras el pretratamiento SNV+2D. En el caso de los espectros crudos, las diferencias en las propiedades de scattering se observan a simple vista, y en mayor medida en las muestras comerciales. Esto debido a que la superficie semiovalada del comprimido comercial dispersa mayor cantidad de luz que la superficie plana de la muestra recomprimida. Además, las muestras compactadas en laboratorio son prácticamente paralelas a los espectros de la muestras de producción, estas diferencias pueden ser atribuidas a las distinta presión de compactación a la que fueron sometidas (3).

**Figura 5-4:** Espectros crudos (A) y pretratados (B) de muestras comerciales y muestras lab-made a concentraciones nominales de cada componente.



La semejanza entre espectros fue evaluada mediante los coeficientes de correlación de las intensidades a cada longitud de onda, y a través de la suma de los cuadrados de diferencias relativas en cada longitud de onda, la cual es usada para calcular el parámetro **b** para cada muestra. Con el fin de tener una referencia del valor mínimo esperable, se calculó un parámetro similar, **Bm**, para evaluar las diferencias entre espectros registrados en diferentes días de la misma muestra. Siendo específicos, **Bm** se calculó como el valor promedio de cinco muestras de producción, las cuales se

almacenaron en un desecador antes y durante los registros espectrales para prevenir posibles cambios espectrales debidos a absorción de humedad.

$$b = \sqrt{\sum_{\lambda=1}^n \frac{(A_i^{comercial} - A_i^{laboratorio})^2}{A_i^{laboratorio}}} \quad \text{Ecuación 5-1}$$

$$B_m = \sqrt{\sum_{\lambda=1}^n \frac{(A_i^{dia 1} - A_i^{dia 2})^2}{A_i^{dia 1}}} \quad \text{Ecuación 5-2}$$

Los resultados se muestran en la tabla 5-1, y se deduce que cualquiera de los pretratamientos evaluados hace que los espectros de muestras comerciales y recompactados sean prácticamente iguales, siendo la combinación de SNV y 2D la que minimiza de mejor manera las diferencias. Cabe resaltar que si bien se obtuvieron correlaciones cercanas a uno para todos los pretratamientos (semejanza entre perfiles espectrales), este parámetro no refleja diferencias cuantitativas entre espectros con el mismo perfil pero diferente intensidad. En este caso la evaluación de los parámetros b en relación a Bm explica de mejor manera la influencia de los pretratamientos. Para un correcto análisis de estos valores, hay que tener en consideración que las derivadas transformaron algunos valores de señal a cerca de cero, lo que provocó un valor exagerado del cociente. Dado que este fenómeno matemático es provocado por el pretratamiento, dichos puntos espectrales se eliminaron del cálculo de b. Otro comentario importante para mencionar es que el valor Bm para SNV fuera superior al del espectro crudo, pudiendo ser explicado por la presencia de amplias zonas

espectrales en el SNV cercanas a cero que, debido a la naturaleza de normalización del pretratamiento provocaron la aparición de valores altos del cociente. (5).

**Tabla 5-1:** Efecto de pretratamientos en las diferencias espectrales entre muestras comerciales y compactadas en el laboratorio (b) y el coeficiente de correlación (CC). B<sub>m</sub> es una medida de la reproducibilidad instrumental.

	Crudos	SNV	1D <sup>a</sup>	2D <sup>b</sup>	SNV+2D <sup>b</sup>
b <sub>1</sub>	383.5	59.8	58.5	56.9	22.4
b <sub>2</sub>	584.2	60.9	57.1	72.0	31.9
b <sub>3</sub>	283.0	74.0	60.1	75.2	55.7
b <sub>4</sub>	360.8	61.2	61.4	71.3	45.0
b <sub>5</sub>	641.1	69.1	72.5	79.2	52.0
B <sub>m</sub>	1.2	4.5	15.2	8.2	5.2
CC	0.9487	0.9985	0.9983	0.9989	0.9993

Otra forma imprescindible de analizar el efecto del pretratamiento espectral es evaluarlo sobre todo el set de muestras confeccionadas. Recordemos que el set de calibración quedó conformado 36 muestras, mientras que el set de validación incluyó 13 muestras confeccionadas en el laboratorio. Las Figuras 5-5A, 5-5B y 5-5C muestran el efecto de los pretratamientos sobre un variado conjunto de espectros NIR. La Figura 5-5A compara el espectro bruto de cada ingrediente activo frente a una tableta comercial. Este tipo de representación es útil para visualizar en una primera instancia las posibles variables de cada componente que contribuyen a la formación del espectro comercial. Queda en manifiesto las fuertes señales de sobre tonos de los grupos OH y C=O cerca de los 1400 nm y 1900 nm provenientes del paracetamol y el ácido acetilsalicílico, además de la banda del grupo NH cerca de los 1500 nm proveniente del paracetamol. Estas bandas son muy intensas, pero algo solapadas, y dan un indicio de la alta contribución que otorgan estos dos componentes en la lectura del espectro de la tableta

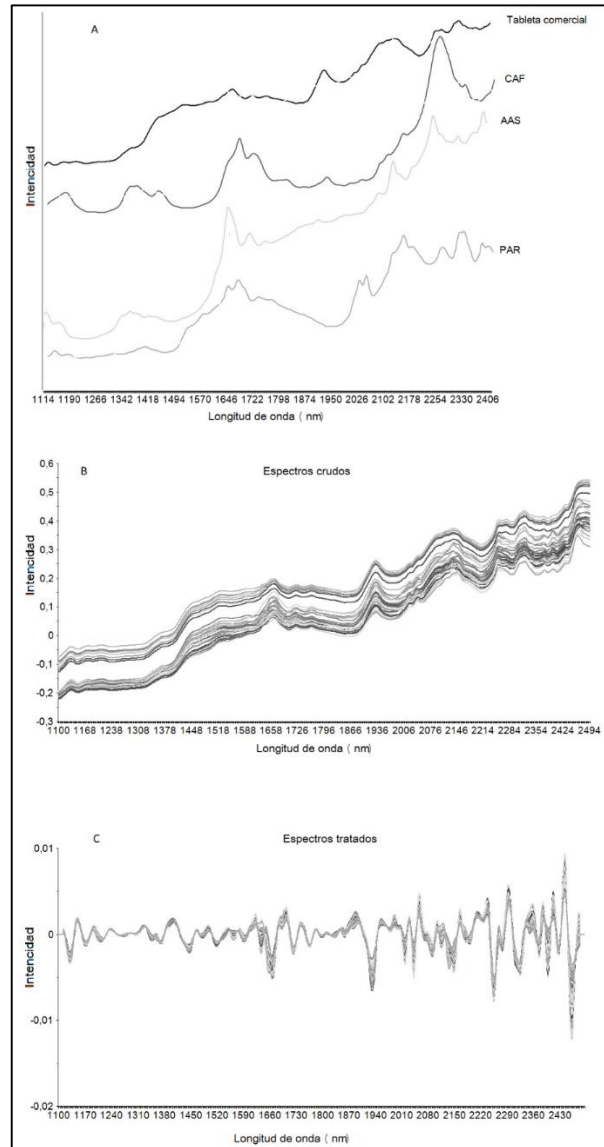


comercial. Por su parte, la molécula de cafeína se ve principalmente representada en el espectro comercial por las bandas provenientes desde sus 3 grupos metilos (1890 nm) contenidos en su estructura cíclica, junto a las vibraciones de estiramiento de los enlaces de C = O, C = C y C = N entre 1900 y los 2300 nm; por lo tanto, estas señales pueden desempeñar un papel importante en la estimación de la cafeína, el cual es el ingrediente activo de menor concentración.

La Figura 5-5B muestra los espectros sin procesar de todo el conjunto de muestras de calibración confeccionadas en el laboratorio. La alta variabilidad espectral resultante del análisis en diferentes días y el efecto de dispersión de la luz es evidente al observar el recorrido de la línea base de todos los espectros. Después de tratar los espectros mediante un SNV seguido de una segunda derivada (2D) utilizando la transformación Savitzky-Golay con 15 puntos de suavizado, la deriva de la línea base y la resolución de las bandas espectrales mejoraron considerablemente (ver figura 5-5C). Por lo que la variabilidad espectral resultante después del tratamiento se debe principalmente a las diferencias en la concentración de cada uno de los ingredientes activos. Así, algunas de las bandas de absorción mencionadas, como la banda de fenol o el enlace N-H ahora son fácilmente perceptibles.

Cabe resaltar que, a pesar de que el pretratamiento de SNV seguido de 2D minimizó las diferencias espectrales, incluyendo las bandas de absorción del agua (centradas en 1440 y 1940 nm). Por lo que sólo bastó con un adecuado almacenamiento de las muestras para omitir el efecto producido por la humedad.

**Figura 5-5:** A) Comparación de los espectros puros de cada API con el espectro crudo de un comprimido comercial; B) y C) Efecto del pretratamiento espectral aplicado sobre el set de calibración.

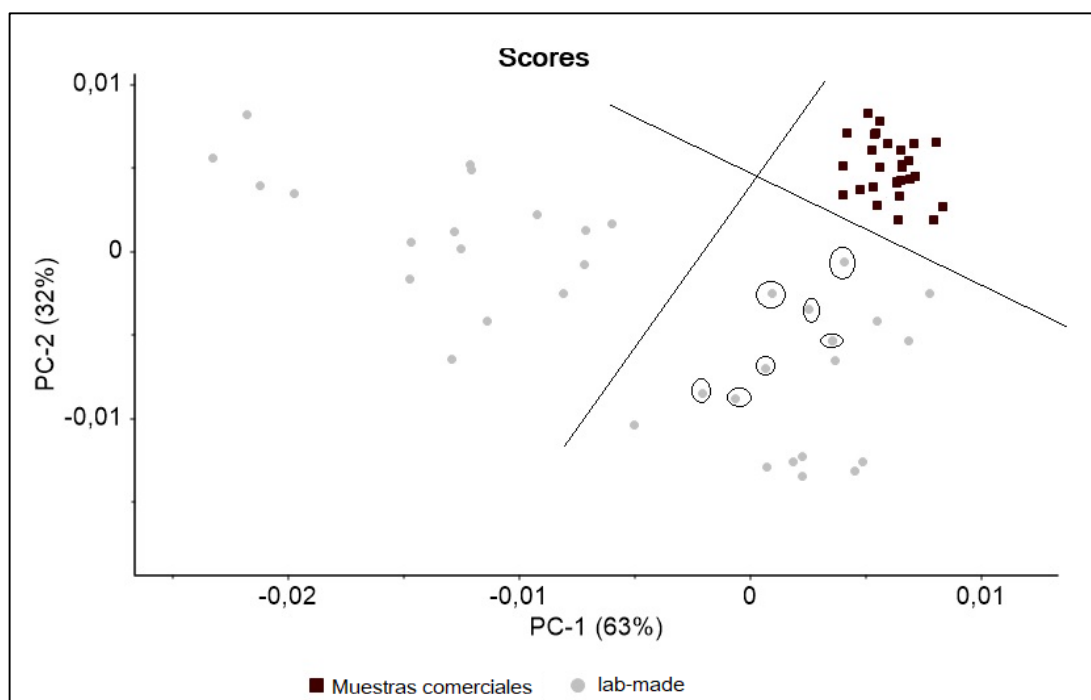


Todo análisis preliminar para la construcción de un modelo cuantitativo debe ir de la mano de un análisis exploratorio de las muestras por medio de un PCA. Para visualizar de forma exploratoria y determinar el grado de semejanza espectral de las muestras del

conjunto de calibración, se realizó un PCA sobre espectros NIR donde se incluyeron tanto muestras comerciales como muestras lab-made. El PCA se desarrolló mediante una validación cruzada completa y con un tratamiento espectral que incluyó una SNV y una 2D. La Figura 5-6 muestra la distribución espacial de las puntuaciones en los dos primeros PC que explican el 95% de la variabilidad encontrada en los datos espectrales. Es posible observar una pequeña agrupación de las muestras comerciales con respecto a las muestras hechas en laboratorio producidas por las diferencias físicas generadas en el proceso de fabricación. Además, las muestras lab-made que contenían concentraciones de API cerca del valor nominal (marcado en un círculo negro) se agrupan muy cerca de las tabletas comerciales, esto indica una relación entre la distribución de las muestras y las concentraciones de API, las cuales se explican en gran medida por los dos primeros PC



**Figura 5-6:** Gráfica bidimensional de la distribución de los scores en relación al PC1 y PC2 del PCA realizado sobre el set de calibración y muestras comerciales.



Con respecto a la espectroscopía Raman, como se mencionó a lo largo del capítulo I, proporciona importante información sobre modos vibracionales fundamentales de las moléculas analizadas. El mayor porcentaje de esta información proviene de la zona espectral denominada huella digital, comprendida entre los  $1830\text{ cm}^{-1}$  y  $275\text{ cm}^{-1}$ . Por lo tanto, todos los análisis efectuados por espectroscopía Raman se realizaron en este intervalo espectral. El pretratamiento espectral en Raman es un poco más limitado en comparación a NIR, en esta ocasión se evaluó la aplicación de una corrección inicial de la línea base de los espectros, seguida de una normalización unitaria de área como algoritmos de tratamiento. De igual forma que para NIR, la Figura 5-7A muestra los espectros de cada API comparado con el de una tableta comercial. Dado que los tres API

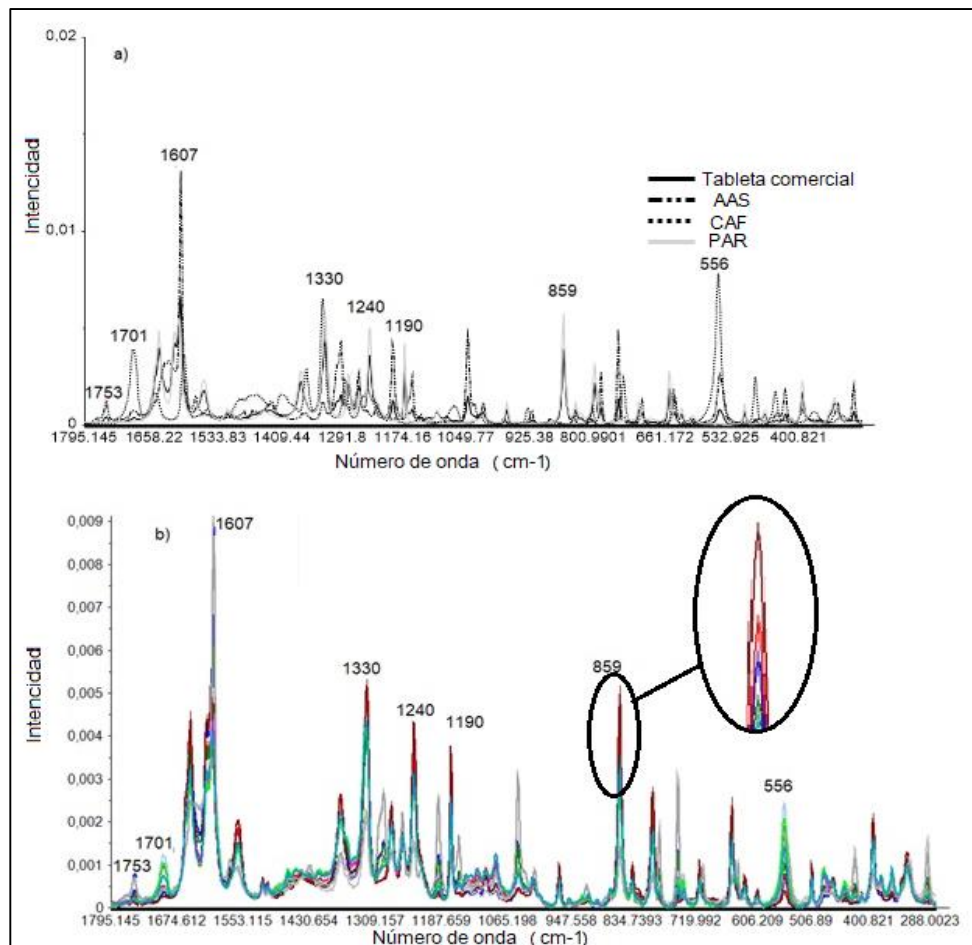
poseen una estructura química comparable (un anillo aromático con pocos sustituyentes), la mayoría de los picos aparecen muy cercanos entre sí. Sin embargo, debido a la especificidad del efecto Raman, se pueden detectar fácilmente pequeñas diferencias entre cada espectro API. Por ejemplo, a  $1753\text{ cm}^{-1}$  se aprecia la influencia el grupo carbonilo del ácido carboxílico perteneciente al ácido acetilsalicílico. También es posible diferenciar el grupo carbonilo cetónico proveniente de la cafeína y ácido acetilsalicílico a los  $1700\text{ cm}^{-1}$ , o la banda a  $556\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a las vibraciones internas en el anillo de pirimidina incluido en la molécula de cafeína. Por otro lado, la contribución del paracetamol en la información del espectro es significativamente mayor en relación a las otras dos APIs. Por ejemplo a los  $1650$  y  $1607\text{ cm}^{-1}$  resaltan las bandas de amida y los picos de vibración en  $1654$  y  $1610\text{ cm}^{-1}$  producto del estiramiento  $\text{C}=\text{O}$  y  $\text{C}=\text{C}$  respectivamente. Y también los picos de flexión y estiramiento simétricos de  $\text{CH}$  entre los  $1260\text{-}1227\text{ cm}^{-1}$ . Esto permite deducir que el paracetamol es el API que tiene una contribución espectral mucho más relevante que sus similares, además los picos de característicos de cafeína están débilmente resueltos y parcialmente superpuestos con las señales de los otros dos analitos, por lo que eventualmente podrían conducir a problemas de cuantificación.

Al comparar las contribuciones espectrales en una mezcla de analitos por espectroscopía NIR y Raman, es necesario resaltar un hecho diferencial que puede ser muy importante. En NIR, los coeficientes de absorción para el mismo tipo de enlaces varían relativamente poco de una molécula a otra, es decir, la contribución al espectro mixto se debe fundamentalmente a la diferencia de concentración. Mientras que en

Raman, la intensidad de la emisión depende linealmente del coeficiente de polarización, que puede variar significativamente de una molécula a otra. En este sentido, la diferencia de contribución al espectro final ya no se extrapola directamente de la diferencia de concentración (6), por lo que un analito que esté a concentraciones bajas puede dar señales más intensas que uno a concentraciones mal elevadas.

Aunque Raman produce picos estrechos y bien resueltos, la similitud estructural entre las API produce un resultado contraintuitivo. Uno esperaría que, debido a la naturaleza de la señal, los espectros NIR fueran mucho más similares que los espectros Raman. Sin embargo, la Tabla 5-2 muestra los coeficientes de correlación entre el espectro puro de cada API (después de los pretratamientos espectrales descritos anteriormente) en relación al espectro de una muestra comercial. Se observa que existen diferencias considerables entre las dos técnicas con respecto a la contribución de cada API en la muestra comercial. Los resultados obtenidos en NIR muestran que la influencia de cada API en la mezcla es relativamente baja y principalmente determinada por su concentración, en cambio en Raman la similitud es mucho mayor y no sigue el orden de concentración.

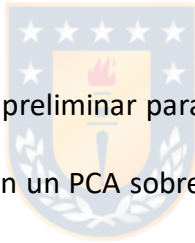
**Figura 5-7:** (A) espectros Raman de los tres ingredientes activos y un comprimido comercial, y (B) ocho espectros Raman de la misma tableta comercial recompactada en diferentes zonas. El espectro Raman se pretrató con una corrección de línea de base en el intervalo 1795-895  $\text{cm}^{-1}$  seguido de una normalización de área.



**Tabla 5-2:** Coeficientes de correlación para cada API respecto a una tableta comercial para ambas técnicas después de aplicar diferentes métodos de preprocesamiento.

	NIR	Raman
ASA	0.46	0.81
CAF	0.31	0.93
PAR	0.45	0.94

La Figura 5-7B muestra los registros de ocho espectros Raman adquiridos en los diferentes puntos establecidos sobre una tableta comercial pulverizada y compactada en el laboratorio. Aunque este tema se discutirá más a fondo en los siguientes párrafos, es necesario mencionar la notable variación de intensidad en algunos picos para la misma muestra, indicando una deficiente distribución de los ingredientes activos en el interior de la tableta, lo que hace imprescindible realizar un estudio cuantitativo para aclarar esta situación.

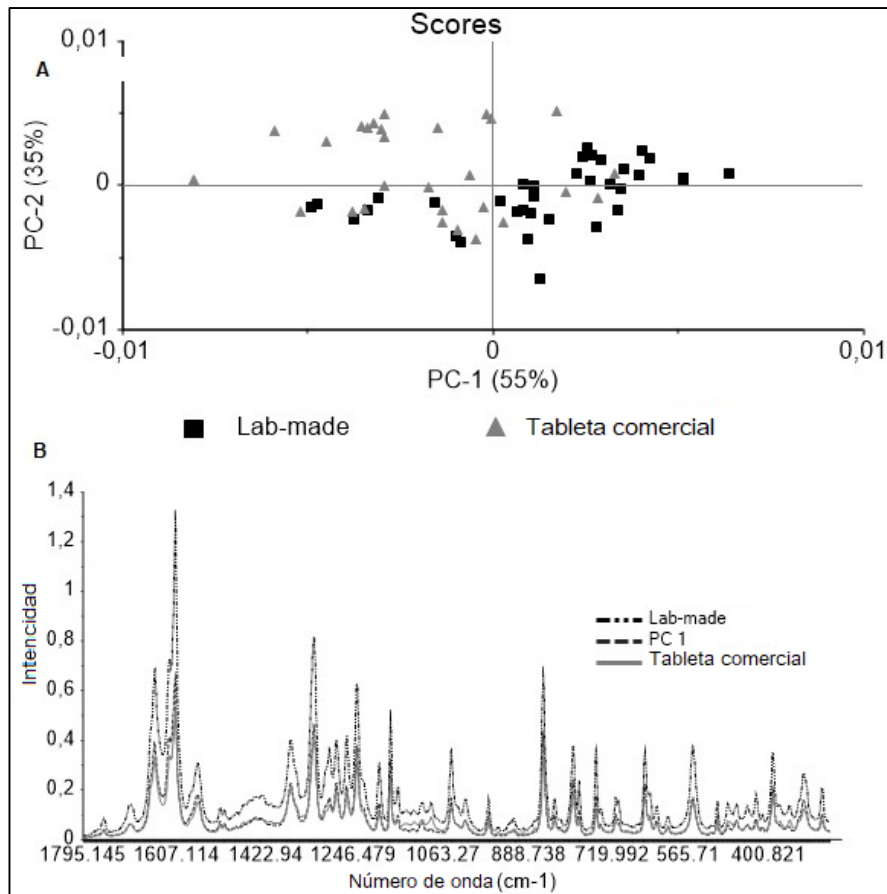


Al igual que en NIR, un estudio preliminar para los espectros Raman de las muestras a analizar contempló la realización un PCA sobre muestras del conjunto de calibración y muestras comerciales. La Figura 5-8A muestra los resultados de este análisis en función de las distribuciones espacial de scores en relación al PC1 y PC2 del PCA. Se puede observar que, en relación a NIR, la reducción de las diferencias físicas de las muestras comerciales y aquellas hechas en laboratorio fue mucho más apreciable visualmente, ya que, como se muestra en la figura 5-8A, en Raman no hubo una agrupación entre las muestras. Esto se debe a que en los espectros Raman las características químicas de las muestras tiene una influencia mucho mayor en las intensidades que la información que contemplan las características físicas. Esta misma conclusión se puede extraer al observar la figura 5-8B, donde se representa de forma lineal el loading del PC1, frente



los espectros de una muestra comercial y al de una muestra lab-made. Se aprecia una gran correlación entre las principales bandas de los espectros y del loading que más variables explica, lo que indica una alta representatividad de los espectros originales en el algoritmo utilizado por el PCA para comprimir las variables.

**Figura 5-8:** A) Gráfica bidimensional de la distribución de los scores de espectros Raman en relación al PC1 y PC2 del PCA realizado sobre el set de calibración y muestras comerciales, B) Representación lineal el loading del PC1, frente los espectros Raman de una muestra comercial y de una muestra lab-made a concentraciones nominales.



### **5.3.2. DESARROLLO Y EVALUACIÓN ANALÍTICA DE LOS MODELOS DESARROLLADOS**

El objetivo de esta sección se centra en la obtención de modelos de calibración fáciles de construir y que a la vez sean robustos y apropiados para realizar controles cuantitativos de los API una vez el producto farmacéutico está terminado.

Se crearon varios modelos de calibración PLS para ambas técnicas, en donde se variaron parámetros como el intervalo espectral de trabajo, el número de factores utilizados para la cuantificación o la inclusión de muestras comerciales al set de calibración. Con el fin de simplificar los resultados, en la Tabla 5-3 sólo se muestran las cifras de mérito que mejor caracterizaron cada modelo PLS desarrollado.

En todos los casos, tanto para NIR como para Raman, los modelos de calibración que mejores resultados entregaron se conformaron por un conjunto de 36 muestras de calibración hechas en el laboratorio más 10 ó 5 tabletas comerciales para NIR o Raman respectivamente. Esto es coherente con la situación descrita anteriormente; los modelos construidos con muestras comerciales permiten incluir variabilidades físicas provenientes de la planta de producción que facilitan las predicciones de los APIs, especialmente para la cafeína como activo de menor concentración.

**Tabla 5-3:** Cifras de mérito de los modelos NIR y Raman PLS para ácido acetilsalicílico, cafeína y paracetamol, el conjunto de calibración incluyó 36 tabletas hechas en laboratorio con 10 y 5 tabletas comerciales para NIR y Raman respectivamente

Técnica	API	Nº de PC	intervalo (%p/p)	pendiente	R <sup>2</sup>	Varianza explicada (%)	RMSECV (%w/w)	RMSEP (%w/w)
NIR								
	AAS <sup>a</sup>	4	20.53-40.91	0.9876	0.9898	98.9	0.57	2.09
	CAF <sup>a</sup>	5	4.31-10.21	0.9865	0.9913	98.1	0.13	0.42
	PAR <sup>b</sup>	4	21.48-31.91	0.9814	0.9815	98.1	0.35	0.61
Raman								
	AAS <sup>c</sup>	4	20.53-40.91	0.9741	0.9713	97.2	0.89	2.12
	CAF <sup>c</sup>	5	4.31-10.21	0.9691	0.9711	97.1	0.30	0.28
	PAR <sup>c</sup>	2	21.48-31.91	0.9650	0.9741	97.7	0.39	1.71

a: 1100-2498 nm; b: 1100-2294 nm; c: 1795-275 cm<sup>-1</sup>

Los mejores parámetros analíticos se obtuvieron a través de la lectura de 4 ó 5 variables latentes, a excepción de la cuantificación de paracetamol mediante Raman que sólo necesito la inclusión de los PC para la mejor cuantificación. La cuantificación de paracetamol mediante NIR se realizó en un intervalo espectral reducido entre 1100-2242 nm. Este recorte del número de variables se debe a que por sobre los 2500 nm la contribución del paracetamol es prácticamente nula, por lo que al limitar en 2242 nm el intervalo de trabajo se mejoran considerablemente las predicciones. Para el resto de las API fue necesario utilizar todo el intervalo espectral, ya que tanto el AAS como la CAF necesitan proveer de una mayor cantidad de información para ser modelados.

La exactitud y la capacidad predictiva del modelo se evaluó en términos de error relativo de las predicciones en la validación externa, utilizando un límite de aceptación correspondiente a un  $\pm 5\%$  de error para cada API. Los valores RMSEP muestran que los modelos NIR desarrollados tienen una alta capacidad predictiva sobre el set de

calibración diseñado (0.42% para cafeína y 0.61% para paracetamol), siendo el modelo para AAS el obtuvo valores de RMSEP más elevados (2.09%) pero dentro de los límites de aceptación.

Como se mencionó en la metodología, la obtención de los espectros Raman se realizó mediante un esquema de cuadrícula prefijado, en donde se registraron 8 ó 10 espectros dependiendo si el comprimido era comercial o lab-made. Sin embargo, como quedó evidenciado en la Figura 5-8B, los espectros Raman para una misma tableta variaron considerablemente en intensidad, obteniéndose variaciones de entre un 15 a 20% dependiendo del número de onda en el que se registró el espectro. Debido a que estas diferencias se presentaron tanto en los comprimidos comerciales como en las lab-made, se puede descartar que las variaciones se deban al distinto proceso de manufactura de las muestras.

Al haber tantas diferencias de intensidad entre cada zona analizada, el promedio de los espectros registrados por tableta no es una medida aritmética confiable para realizar los cálculos de cuantificación, de hecho, al utilizar el promedio de los espectros se obtuvo parámetros analíticos inapropiados para los objetivos. Para corregir estos errores, y obtener una medida aritmética representativa de los registros, se ordenaron los espectros de cada tableta en relación a la magnitud de su intensidad, y se identificó el espectro correspondiente a la **mediana** de los registros. El uso de este parámetro estadístico le otorga confiabilidad a los resultados cuando la variación de las señales es considerablemente alta, por lo que los modelos y las predicciones para Raman se

realizaron a través de la mediana de los registros. Más adelante se presentará una explicación probable de esta alta diferencia anormal entre los espectros registrados.

La tabla 5-3 muestra las cifras de mérito de los mejores modelos de calibración Raman desarrollados. En general, los valores fueron bastante similares a los proporcionados por la espectroscopía NIR (técnica esencialmente cuantitativa). Para los tres ingredientes activos, las mejores predicciones se obtuvieron mediante el uso de la media aritmética del espectro, con RMSEP inferior al 2.12% p / p para ASA, 1.7 1 a PAR y 0.28 a CAF.

Para una mejor visualización de la capacidad predictiva de los modelos desarrollados, en la tabla 5-4 se muestra el contenido completo de las predicciones efectuadas para la validación externa, comparadas con los resultados de los análisis mediante la metodología HPLC de referencia. Es evidente que los valores promedio obtenidos por las tres técnicas coinciden (una prueba t muestra que no hay diferencias significativas para  $\alpha = 0.05$ ); la precisión de los métodos espectroscópicos es ligeramente peor que la de HPLC, pero perfectamente aceptable según los estándares de calidad de la industria.

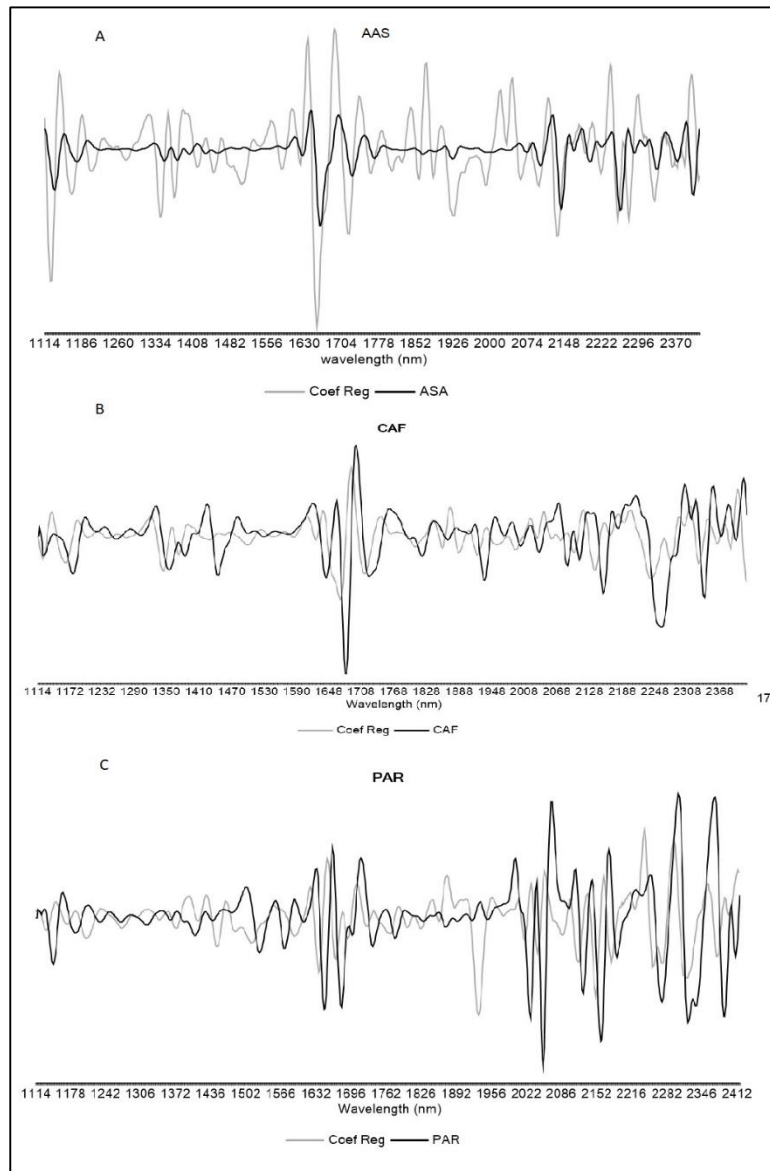
Una exactitud adecuada de las predicciones está relacionada con la selectividad de la metodología frente a la detección de los Apis. La USP señala que para evaluar este parámetro, los coeficientes de regresión calculados en los modelos pueden ser representados comparando las regiones con una alta correlación respecto al espectro puro del analito.

Siguiendo esta idea, en las figuras 5-9 y 5-10 comparan el coeficiente de regresión de la primera variable latente del modelo PLS desarrollado frente al espectro puro de su

respectivo API. En los modelos NIR (Figura 5-4) el PC1 explicó el 60.4 % de la varianza Y para AAS, un 55.7% para CAF y un 64.3 % para PAR. Si bien, el primer PC no explica el mayor porcentaje de las diferencias espectrales, la inclusión de un segundo componente eleva la varianza explicada a sobre un 80% para cada modelo. A pesar del porcentaje de varianza contenida en el PC1, los gráficos indican fuertes coincidencias espectrales entre los espectros API y los coeficientes de regresión en ambas técnicas. En el gráfico NIR (Figura 5-9), como se puede observar, la relación de las bandas de absorción del espectro puro de AAS y su respectivo coeficiente de regresión es menor en comparación con otros APIs, (CC: 0.54). Por otro lado, los coeficientes de regresión para los modelos de PAR y CAF (0.68 y 0.55 respectivamente) no solo tienen fuertes coincidencias espectrales con sus espectros puros, sino que también tienen bandas de influencias negativas que indican la ausencia de la API. Esto explica que las predicciones para CAF fueran más precisas que las de AAS a pesar de las diferencias de concentraciones entre ellos.

Para Raman la situación fue similar, los tres APIs se relacionaron adecuadamente con los coeficientes de regresión de sus modelos. Sin embargo, pesar del que el porcentaje de varianza explicada por el PC para Raman (75 % para AAS, 70% para CAF y un 72% para PAR) fue superior a los de NIR, esto no se vio reflejado en el valor los CC (0.49 para AAS, 0.51 para PAR y 0.54 para CAF). Estos datos demuestran la alta capacidad de cuantificación de las metodologías NIR por sobre Raman, siendo esta última destinada mayoritariamente a análisis de identificación.

**Figura 5-9:** Espectro de componentes puros de cada API y la representación lineal de los coeficientes de regresión de los modelos PLS NIR (A; AAS, B; CAF y C; PAR).



Como se mostró en la tabla 5-3, las predicciones para PAR y AAS fueron las esperadas presentando un error mayor en Raman que en NIR. Por el contrario, la cuantificación de CAF, mostró considerables mejoras al ser analizadas por Raman. En la figura 5-10 se puede observar que hay muchas bandas características para AAS y PAR a la misma

longitud de onda que son incluidas en sus respectivos modelos. Estas variables generan una dificultad en modelo para detectar el analito a cuantificar y por consiguiente, un mayor error de predicción. La exclusión de estas variables empeoraron las predicciones, ya que, si bien no son selectivas para los analitos, contienen información importante y útil para generar predicciones adecuadas a los requerimientos. Por su parte CAF, posee un menor número de bandas de absorción visualmente apreciables, pero posee una elevada contribución espectral (tabla 5-2) producto de su señales intensas y características altamente correlacionadas con su coeficiente de regresión, lo que se traduce en una alta capacidad predictiva.

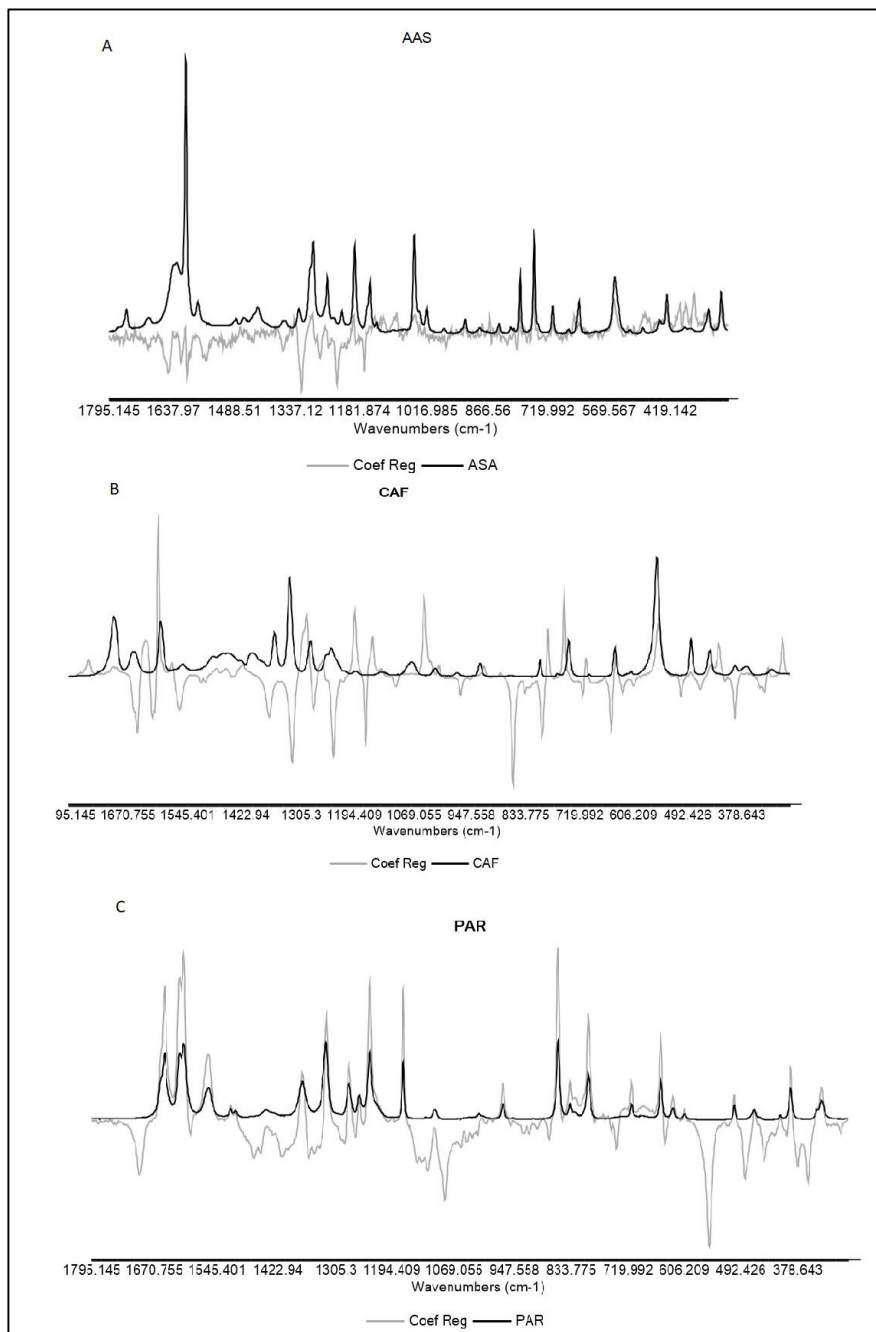
Finalmente, todos los modelos desarrollados fueron sometidos a estudios de precisión evaluados en términos de la repetibilidad y precisión intermedia.

La Tabla 5-5 muestra los resultados de este estudio expresados en función de la desviación estándar relativa. Los valores de %RSD para cada API que utiliza la espectroscopía NIR fueron inferiores al 2 % en repetibilidad y precisión intermedia y menores del 3 % utilizando la espectroscopía Raman. Como era de esperarse, los mejores resultados se obtuvieron mediante espectroscopía NIR y esto obviamente se debe a la facilidad que tiene el instrumento para obtener los espectros. Por otro lado, la espectroscopía Raman, al irradiar la muestra con un láser monocromático, incluye una etapa de enfoque de la muestra, haciendo que la toma del espectro sea menos reproducible.

En cualquier caso, ambas técnicas entregaron resultados de precisión adecuados.



**Figura 5-10:** Espectro Raman de los componentes puros de cada API y la representación lineal de los coeficientes de regresión de los modelos PLS Raman (A; AAS, B; CAF y C; PAR).



**Tabla 5-5:** Valor de precisión expresado como %RSD obtenido con los modelos PLS NIR y Raman.

Técnica	API	Repetibilidad (n=10)	Precisión intermedia (n=7)
NIR	AAS	1.24	1.54
	CAF	1.82	1.95
	PAR	1.05	1.28
Raman	AAS	2.53	2.87
	CAF	2.09	2.16
	PAR	1.98	2.07

Finalmente, fue posible desarrollar modelos quimiométricos PLS NIR y Raman para cuantificar el ácido acetilsalicílico, la cafeína y el paracetamol a partir de tabletas comerciales y de laboratorio. Los parámetros analíticos obtenidos fueron estadísticamente comparables a los de la HPLC y en concordancia con los requisitos para la industria farmacéutica, pudiendo usarse perfectamente para controles como la mencionada prueba de uniformidad de contenido para dosis única. Además, la espectroscopía Raman proporcionó información adicional sobre distribución de los componentes dentro de la tableta.

### 5.3.3.EFECTO DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA

La reproducibilidad de un espectro Raman puede considerarse debido a tres factores independientes: el error analítico de medición  $s^2_a$ ; error de submuestreo  $s^2_s$ ; y el efecto de dispersión de la radiación  $s^2_m$ .

El error de medición analítica depende esencialmente de la relación señal / ruido y puede modularse modificando parámetros instrumentales: número de escaneos promediados y resolución espectral principalmente. El error de submuestreo ocurre porque, dado el pequeño volumen de muestra analizado, el número de partículas de

analito que emiten radiación Raman varía de un punto a otro; la variabilidad de dispersión incluye ambos elementos de la muestra (micro diferencias en su superficie, pequeñas diferencias en el enfoque, oscilación de la potencia del láser, etc.) y se minimiza en gran medida por una normalización espectral adecuada (7).

En espectros normalizados, la variabilidad espectral se puede simplificar como se produce por dos factores.

$$s_t^2 = s_a^2 + s_s^2 \quad \text{Ecuación 5-1}$$

donde:  $s_a^2$  es la varianza instrumental y  $s_s^2$  la variabilidad debido al error de submuestreo. Aunque el concepto de error de submuestreo es bastante intuitivo, no es fácil demarcar sus dos componentes: la variabilidad aleatoria en muestras uniformes y la variabilidad producida por una distribución incorrecta del analito en la muestra. En el primer caso, cuando se grafican los resultados obtenidos en diferentes sitios de la superficie de la tableta, uno esperaría un resultado más o menos estrecho (8), por ejemplo, distribución gaussiana. En el caso de una distribución API no uniforme, uno esperaría sitios con mayor contenido API (acumulación de partículas de API) y puntos con menor concentración, en una distribución no gaussiana.

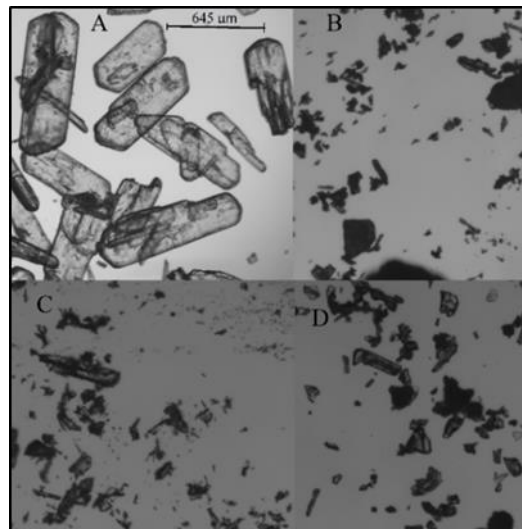
En el análisis químico clásico de sólidos particulados, el error de submuestreo puede explicarse aplicando los conceptos básicos de distribución binomial (9). Ya existe un historial de su aplicación en Raman en el caso de la microscopía confocal, pero la estimación numérica precisa del error producido no es posible en la espectroscopía Raman convencional. El principal problema que limita su aplicación es que es imposible

calcular el número total de partículas irradiadas. De hecho, es imposible estimar con precisión el volumen de muestra analizada. Aunque es posible estimar una penetración de aproximadamente 1.4-1.5 mm, depende del tamaño de partícula y, además, se sabe que a medida que la radiación penetra, la participación de las partículas de analito más profundas es menor. Por otro lado, aunque el rayo láser tiene un diámetro bien definido, debido a la dispersión de la radiación dentro de la muestra, las partículas fuera del cilindro irradiado pueden emitir radiación láser recolectada por el detector. Sin embargo, los conceptos involucrados pueden ser útiles para la interpretación cualitativa de los resultados obtenidos.

En el presente caso, si se supone que el volumen muestreado está definido (en un primer enfoque) por un cilindro de radio de 0.25 mm y 1.4 mm de altura (volumen muestreado total  $2.7 \cdot 10^8 \mu\text{m}^3$ ), ya que el volumen promedio de las diferentes partículas se puede estimar que es posible calcular el número total de partículas y el número esperado de partículas de analito en el volumen muestreado.

La Figura 5-11 muestra una imagen SEM de las diferentes API analizadas. Se puede observar que las partículas tienen una morfología que puede ser aproximada por un prisma de base cuadrada con un borde de la base que es aproximadamente  $\frac{1}{4}$  de la longitud de la misma.

**Figura 5-11:** Imágenes microscópicas de las partículas de AAS (A), CAF (B), PAR (C) y excipientes (D)



En la tabla 5-6, se muestran las longitudes promedio de los cuatro componentes (tres API y el excipiente principal) de la muestra y el volumen promedio estimado de cada partícula. Si suponemos que todos tienen la misma densidad y que el volumen analizado está totalmente ocupado por las partículas, se puede estimar un orden de magnitud del número de partículas de cada analito presente (n), ver tabla 5-6

**Tabla 5-6:** Tamaño y números de partículas (n) para cada componente de la tableta.

	Largo (μm)	Ancho (μm)	Volume (μm <sup>3</sup> )	n
AAS	645	161	8385504	9
CAF	59	14	6418	3000
PAR	56	14	5488	13000
Excip	84	21	18522	6000

Además, debe tenerse en cuenta que, aunque los modelos Raman que utilizan la mediana espectral producen buenos resultados en la cuantificación de las tres API, el

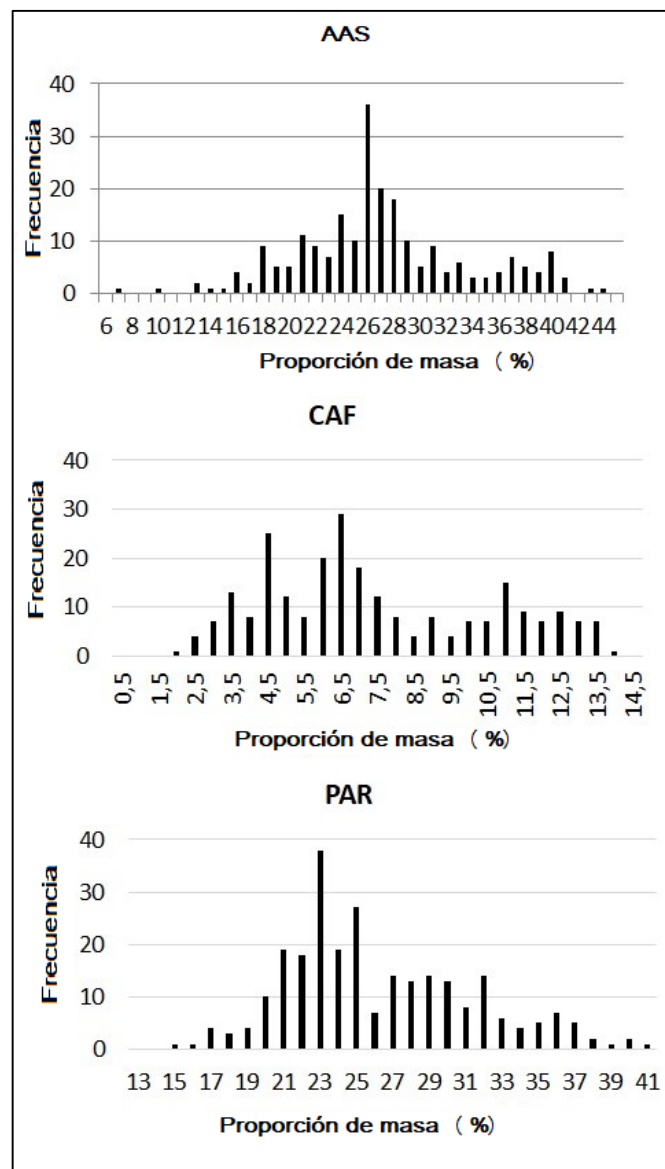
número de sitios en la tableta que deben muestrearse es demasiado alto para el uso rutinario. Sin embargo, puede ser una buena herramienta analítica para verificar si el proceso de fabricación es adecuado. Esto podría realizarse determinando el error de submuestreo en una tableta cuidadosamente preparada (planta piloto) para demostrar que son perfectamente homogéneas. Por lo tanto, un control aleatorio de alguna tableta en producción que dio un error significativamente mayor sería indicativo de que el proceso de fabricación es incorrecto.

La Figura 5-12 muestra los histogramas obtenidos al representar los valores de las concentraciones individuales de 25 tabletas comerciales (10 puntos / tableta). Para AAS, se observa una distribución simétrica que indica que la API está distribuida uniformemente, con una concentración promedio que coincide con el valor nominal, pero con una gran dispersión de puntos de concentración alta y baja formando una distribución que se ajusta a una distribución de Laplace. Esta función de distribución se ha utilizado especialmente en el mundo de la economía para describir y anticipar algunos procesos, así como algunos fenómenos meteorológicos aleatorios (10). La interpretación cualitativa del mismo es relativamente simple, dado que el pequeño número de partículas incluidas en el volumen muestreado es muy probable que encuentre valores de concentración extremadamente más altos y más bajos que el valor nominal.

Por otro lado, el tamaño de partículas AAS relativamente grande condiciona la distribución de las API sobrantes. Donde CAF, el componente minoritario de la muestra, tiene dos curvas de distribución, una centrada alrededor del 5.5% p / p (DE: 1.7) y otra

menos del 11.3 % p / p (DE: 1.2). Podría interpretarse como la "brecha" formada por la ausencia de partículas AAS que, en parte, está llena de partículas CAF, que tienen cierta tendencia a aglomerarse. El número de partículas PAR es mucho mayor que el de CAF. A pesar de esto, también se detecta una distribución doble centrada en torno al 22.8% y el 32.1 %.

**Figura 5-12:** Histogramas de valores de concentraciones individuales de 25 tabletas comerciales (10 puntos / tableta) para cada API.



**Tabla 5-4:** Comparación de los valores hallados de contenido en API mediante los modelos desarrollados con los valores HPLC de referencia

Muestra	AAS				CAF				PAR			
	HPLC	NIR	Raman Prom	Raman Med	HPLC	NIR	Raman Prom	Raman Med	HPLC	NIR	Raman Prom	Raman Med
Comer 1	25,60	26,11	21,27	21,17	6,70	6,56	6,04	6,03	25,30	25,34	26,48	25,09
Comer 2	29,60	29,72	23,81	21,97	6,40	7,14	7,75	6,47	23,80	23,81	25,09	23,23
Comer 3	29,00	28,05	29,68	26,72	7,10	6,69	7,58	7,60	24,20	24,23	24,37	23,32
Comer 4	24,82	27,17	24,38	24,46	6,67	6,57	7,15	6,65	24,82	25,04	24,50	23,96
Comer 5	25,46	25,07	26,52	24,66	6,16	6,07	6,34	6,12	25,46	25,61	26,83	26,12
Comer 6	26,70	25,95	28,34	27,86	6,80	6,57	7,04	6,60	26,70	25,55	25,54	25,49
Comer 7	25,80	25,45	27,61	27,34	6,10	6,10	6,53	5,81	25,80	25,48	26,00	24,37
Comer 8	25,70	22,71	28,43	27,89	6,70	5,67	7,49	6,89	25,70	26,20	25,23	24,50
Comer 9	24,20	31,04	26,36	24,59	7,10	7,11	7,69	7,09	24,20	24,53	28,03	28,35
Comer 10	24,90	23,30	26,49	25,59	6,50	5,41	7,44	6,61	24,90	26,14	26,35	24,34
Comer 11	25,20	30,96	26,60	26,45	7,10	7,21	6,71	6,89	25,20	24,18	26,51	25,81
Comer 12	25,20	23,74	24,67	26,07	6,20	5,96	7,56	6,70	25,20	25,22	26,71	23,66
Comer 13	27,10	26,52	29,12	28,86	6,80	6,43	7,94	6,76	26,10	24,59	25,18	25,08
Comer 14	24,90	24,01	27,85	25,44	6,30	5,75	7,05	6,16	24,90	25,36	24,17	23,53
Comer 15	25,02	25,15	26,88	26,47	6,52	5,73	7,57	6,78	26,00	25,30	24,52	24,94
Comer 16	25,82	26,17	23,38	25,46	6,37	6,37	7,01	6,35	24,62	24,15	25,54	24,32
Comer 17	25,46	25,07	26,52	24,66	6,46	6,47	6,04	6,22	26,32	26,58	26,98	26,12
Comer 18	26,20	25,95	28,34	26,86	6,01	6,07	7,04	6,20	25,71	25,55	25,98	25,49
Comer 19	25,30	25,15	27,61	26,34	6,30	6,10	6,53	6,19	25,98	25,41	26,00	25,37
Comer 20	25,70	22,71	28,43	27,89	6,70	5,67	7,49	6,89	24,71	24,96	25,54	24,50
Lab-made 1	31,79	30,92	32,75	31,99	6,34	6,02	5,67	5,98	25,83	25,67	29,39	25,01
Lab-made 2	23,23	23,28	26,64	24,85	4,76	4,70	5,07	4,82	30,61	30,39	29,08	29,31
Lab-made 3	24,34	24,33	25,57	23,61	5,14	5,07	5,80	5,09	29,09	29,13	29,86	30,21
Lab-made 4	22,79	23,02	25,76	23,61	4,36	4,43	4,83	4,57	29,69	29,98	27,04	29,14
Lab-made 5	27,88	28,31	25,27	26,66	6,99	7,07	6,62	7,27	26,19	26,99	27,33	26,80
Lab-made 6	27,90	27,06	26,82	27,01	7,15	7,08	8,60	6,95	28,91	28,27	26,09	27,99
Lab-made 7	28,80	29,00	26,42	27,06	8,20	8,37	8,51	8,83	27,80	27,85	29,16	27,16
Lab-made 8	26,20	25,94	23,24	25,72	6,50	6,39	6,01	6,35	30,00	29,90	32,47	30,74
Lab-made 9	26,30	27,37	21,32	25,15	6,70	6,74	6,34	6,58	30,40	29,61	31,98	30,94
Lab-made 10	25,70	26,59	22,84	24,69	7,20	7,40	8,40	7,28	30,00	29,83	34,77	31,40
Lab-made 11	24,34	24,33	25,57	23,61	5,14	5,07	5,80	5,09	27,28	27,05	29,86	27,45
Lab-made 12	22,79	23,02	25,76	23,61	4,76	4,63	4,83	4,67	28,32	28,45	28,98	28,03
Lab-made 13	23,88	23,31	25,27	24,66	6,99	7,07	6,32	7,03	25,12	25,35	26,37	25,54



#### 5.4. CONCLUSIONES

Se desarrollaron modelos en base a espectroscopía NIR y Raman para la cuantificación de paracetamol, ácido acetilsalicílico y cafeína de una tableta farmacéutica comercializada en Chile.

La inclusión de muestras comerciales en el conjunto de calibración es fundamental para mejorar la capacidad predictiva de los modelos, tanto para NIR como para Raman. Sin embargo, para este último no se necesitaron más de cinco muestras comerciales para obtener parámetros analíticos adecuados para la industria farmacéutica, con errores de predicción con respecto a un valor nominal inferior al 6 %, resultados aceptables para la industria.

En espectroscopía Raman con múltiples mediciones (mapeo o punto a punto) el uso del valor estadístico de la mediana logró ser más representativo que el promedio cuando la variación de las intensidades entre una medición y otra es considerablemente mayor (más del 15 %).

El uso de la espectroscopía Raman para el análisis de la tableta farmacéutica permitió estimar la distribución de cada ingrediente activo. Los resultados mostraron una distribución no homogénea probablemente debido al tamaño de las partículas de los ingredientes activos especialmente AAS. Aunque los resultados muestran que las tabletas están bien fabricadas, ya que los valores promedio y la desviación estándar estaban dentro de los límites aprobados, debe reconocerse que la desviación estándar tanto en HPLC como en técnicas espectroscópicas es relativamente alta. Ese hecho, unido a la

distribución irregular detectada, sugiere que el tamaño de partícula (especialmente para AAS) produce un riesgo no despreciable de obtener una producción no conforme.

En términos generales, el NIR permite el desarrollo de métodos cuantitativos más simples y rápidos, pero el Raman se ve menos afectado por la presencia de humedad y, en casos de tabletas divisibles, hace posible la evaluación de la uniformidad del contenido en los fragmentos potenciales (mitades o habitaciones) de una manera no destructiva

## 5.5. REFERENCIAS

- 1) Arruabarrena, J., Coello, J., & Maspoch, S. (2012). *Enhancing sensitivity and precision on NIR reflectance determination of an API at low concentration: Application to an hormonal preparation. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 60, 59-64.*
- 2) ICH, I. (2005, November). *Q2 (R1): Validation of analytical procedures: text and methodology. In International Conference on Harmonization, Geneva.*
- 3) Wahl, P. R., Pucher, I., Scheibelhofer, O., Kerschhaggl, M., Sacher, S., & Khinast, J. G. (2017). *Continuous monitoring of API content, API distribution and crushing strength after tableting via near-infrared chemical imaging. International journal of pharmaceutics, 518(1-2), 130-137.*
- 4) Blanco, M., & Alcalá, M. (2006). *Content uniformity and tablet hardness testing of intact pharmaceutical tablets by near infrared spectroscopy: a contribution to process analytical technologies. Analytica chimica acta, 557(1-2), 353-359.*
- 5) Fearn, T., Riccioli, C., Garrido-Varo, A., & Guerrero-Ginel, J. E. (2009). *On the geometry of SNV and MSC. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 96(1), 22-26.*

- 6) Long, D. A. (1953). *Intensities in Raman spectra I. A bond polarizability theory*. *Proc. R. Soc. Lond. A*, 217(1129), 203-221.
- 7) Gómez, D. A., Coello, J., & Maspocho, S. (2019). *The influence of particle size on the intensity and reproducibility of Raman spectra of compacted samples*. *Vibrational Spectroscopy*, 100, 48-56.
- 8) Pralle, R. S., Weigel, K. W., & White, H. M. (2018). *Predicting blood  $\beta$ -hydroxybutyrate using milk Fourier transform infrared spectrum, milk composition, and producer-reported variables with multiple linear regression, partial least squares regression, and artificial neural network*. *Journal of dairy science*, 101(5), 4378-4387.
- 9) Šašić, S., & Whitlock, M. (2008). *Raman mapping of low-content active-ingredient pharmaceutical formulations. Part II: statistically optimized sampling for detection of less than 1% of an active pharmaceutical ingredient*. *Applied spectroscopy*, 62(8), 916-921.
- 10) Burke, E. J., Perry, R. H., & Brown, S. J. (2010). *An extreme value analysis of UK drought and projections of change in the future*. *Journal of Hydrology*, 388(1-2), 131-143.

## CAPITULO VI

### 6. CONCLUSIONES



Se han desarrollado estrategias y metodologías analíticas diseñadas para evaluar aquellos parámetros considerados como críticos en la fabricación de comprimidos farmacéuticos. Para ello se utilizaron técnicas espectroscópicas como la espectroscopía NIR, Vis-NIR y la espectroscopía Raman, además de modelos de calibración multivariantes para la interpretación de los datos. A continuación se describen las principales conclusiones derivadas del trabajo de investigación presentado en esta memoria.

- Se desarrollaron modelos de calibración PLS utilizando espectroscopía NIR y Raman para la cuantificación de paracetamol, ácido acetilsalicílico y cafeína en un comprimido farmacéutico comercializado en Chile. El modelo PLS desarrollado constituyó un método rápido de análisis demostrando la idoneidad del mismo como un método alternativo a los convencionales (HPLC).



- Para el análisis de comprimidos farmacéuticos mediante espectroscopía Raman con múltiples medidas, el uso del valor estadístico de la mediana de las mediciones es más representativo que el promedio cuando la variación de las intensidades entre una medición y otra es considerablemente mayor. Además, esta metodología permitió estimar la distribución de cada ingrediente activo, demostrando una distribución no homogénea dentro del comprimido, probablemente debido al tamaño de las partículas de los ingredientes activos especialmente AAS. Estos resultados hacen de la espectroscopía Raman una potente herramienta analítica para detectar atributos de calidad imperceptibles por otras técnicas.

Se estudió la monitorización de un proceso mezclado en donde se comparó la capacidad de diferentes metodologías y estrategias estadísticas utilizadas para detectar el tiempo óptimo en que la mezcla alcanza la homogeneidad.

- El método cuantitativo basado en el desarrollo de un modelo PLS para la determinación de los APIs en las distintas zonas del mezclador, es la metodología que entrega resultados semejantes a los de HPLC para determinar el punto final del mezclado y la concentración final en la mezcla. En cuanto a métodos alternativos a los cromatográficos se refiere, este es probablemente el método más adecuado para el objetivo, pero requiere mayor demanda de tiempo para el análisis de datos y para la elaboración del modelo propiamente tal.

- Para el análisis de estrategias cualitativas, se observó diferencias en la capacidad para identificar el punto final del proceso dependiendo la estrategia utilizada para ello. Los métodos cualitativos de desviación estándar de un bloque móvil (MBSD) y el basado en la desviación estándar de la diferencia entre dos espectros consecutivos (DIS) son incapaces de detectar con precisión el punto final del mezclado cuando la cantidad de espectros adquiridos durante el proceso es reducido (análisis discontinuo). Sin embargo, al incluir espectros de referencia, como lo fue en las estrategias de disimilaridad del promedio de un bloque móvil contra un espectro de una mezcla homogénea (espectro objetivo) (DMBA-TS) y la disimilaridad frente a un espectro referencia (DIS-ATS), los resultados mejoraron sustancialmente permitiendo detectar el minuto en el que se alcanza la homogeneidad del mezclado.

• El método PCA ha demostrado ser una herramienta que otorga sensibilidad para detectar el punto final del proceso de mezclado a través de la variabilidad de los scores. Además, el método PC-SDA resultó ser una estrategia que presenta la ventaja de determinar estadísticamente el punto final del proceso de mezcla, lo que garantiza una mayor seguridad en la interpretación de datos. Esto se consiguió al realizar muestreos desde el interior del mezclador determinando el tiempo de mezclado óptimo con un 90% de confianza. El análisis continuo y mediante muestreo segregado, incorporaron un error analítico que imposibilitó la obtención de un espacio de diseño con un nivel de confianza más elevado. Sin embargo pequeñas mejoras en tecnología farmacéutica permitirían desarrollar metodologías acordes a los requerimientos de calidad comparables con las metodologías de referencia y aquellas compatibles con iniciativa PAT.

Las metodologías desarrolladas en esta tesis aportan soluciones a situaciones reales de problemáticas en la industria farmacéutica, y las metodologías desarrolladas son susceptibles de ser utilizados en rutina o en el mejor de los casos, como metodologías de elección.