

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Descripción	Página
<i>Capítulo 1. Introducción</i>		
1.1.	Objetivo de la tesis doctoral	1
1.2.	Estructura de la tesis doctoral	2
1.3.	Notación	3
1.4.	Métodos analíticos para el análisis de muestras complejas	7
1.4.1.	Control de calidad de fármacos	7
1.4.2.	Monitoreo de drogas terapéuticas	8
1.4.3.	Selección de métodos analíticos	10
1.4.3.1.	Clasificación de los métodos analíticos	10
1.4.3.2.	Criterios para la selección de métodos analíticos	13
1.4.4.	Métodos analíticos de Farmacopea	14
1.4.5.	Metodología analítica utilizada en la tesis	16
1.5.	Diseño experimental	19
1.5.1.	Quimiometría	19
1.5.2.	Diseño estadístico de experimentos	19
1.5.3.	Optimización experimental	24
1.5.3.1.	Diseños de cribado	25
1.5.3.2.	Diseños de optimización	28
1.6.	Validación de métodos analíticos	39
1.6.1.	Concepto de validación	39
1.6.2.	Parámetros de calidad	40
1.6.2.1.	Precisión	41
1.6.2.2.	Exactitud	43
1.6.2.2.1.	Evaluación en un intervalo reducido de concentraciones	47
1.6.2.2.2.	Evaluación en un intervalo amplio de concentraciones	52
1.6.2.3.	Linealidad	61
1.6.2.4.	Límite de detección	66
1.6.2.5.	Límite de cuantificación	68
1.6.2.6.	Rango	68

---

Descripción	Página
1.6.2.7. Sensibilidad	69
1.6.2.8. Selectividad	70
1.6.2.9. Robustez	72
1.7. Calibración multivariada	74
1.7.1. Introducción	74
1.7.1.1. Instrumentos de orden cero	75
1.7.1.2. Instrumentos de primer orden	76
1.7.1.3. Instrumentos de segundo orden	77
1.7.1.4. Instrumentos de orden superior	78
1.7.1.5. Métodos de calibración multivariada	79
1.7.2. Métodos de calibración multivariada para modelar respuestas lineales	82
1.7.2.1. Métodos de calibración inversa	82
1.7.2.2. Regresión por cuadrados mínimos parciales	83
1.7.2.3. Preprocesamiento de datos	87
1.7.2.4. Número óptimo de factores	90
1.7.2.5. Parámetros estadísticos indicadores de la calidad del ajuste	92
1.7.2.6. Detección de muestras anómalas	93
1.7.2.7. Cifras de mérito en calibración multivariada	94
1.7.3. Métodos de calibración multivariada para modelar respuestas no lineales	96
1.7.3.1. NL-PLS y SPL-PLS	96
1.7.3.2. Redes neuronales artificiales	98
1.7.3.2.1. Principio de las redes neuronales	98
1.7.3.2.2. Estructura de red óptima	100
1.7.3.2.3. Redes neuronales en calibración multivariada	101
1.7.3.2.4. Desarrollo de modelos de calibración	103

---

---

Descripción	Página
<i>Capítulo 2. Desarrollos Analíticos</i>	
2.1. Determinación de dexametasona fosfato de sodio en inyectables	106
2.1.1. Dexametasona fosfato de sodio. Características y antecedentes analíticos	106
2.1.2. Optimización y validación de un método espectrofotométrico para la determinación de dexametasona fosfato de sodio en inyectables	107
2.1.2.1. Método Analítico	107
2.1.2.1.1. Equipamiento	108
2.1.2.1.2. Reactivos	108
2.1.2.2. Optimización	109
2.1.2.3. Validación	112
2.1.2.4. Conclusiones	115
2.1.3. Determinación simultánea de dexametasona fosfato de sodio y de dos excipientes (creatinina y propilparabeno) en inyectables	115
2.1.3.1. Método Analítico	115
2.1.3.1.1. Equipamiento	115
2.1.3.1.2. Reactivos	120
2.1.3.1.3. Diseño del juego de muestras de calibración	120
2.1.3.1.4. Diseño de los juegos de muestras de validación	121
2.1.3.2. Resultados	122
2.1.3.3. Conclusiones	128
2.2. Determinación de dextropropoxifeno y dipirona en inyectables	129
2.2.1. Dextropropoxifeno y dipirona. Características y antecedentes analíticos	129
2.2.2. Método analítico	129
2.2.2.1. Equipamiento	130
2.2.2.2. Reactivos	130
2.2.2.3. Diseño de los juegos de muestras de calibración	131
2.2.2.4. Diseño de los juegos de muestras de validación	131
2.2.3. Resultados	133
2.2.4. Conclusiones	140

---

---

Descripción	Página
2.3. Determinación de carbamazepina en muestras de suero humano	141
2.3.1. Carbamazepina. Características y antecedentes analíticos	141
2.3.2. Método analítico	142
2.3.2.1. Métodos de referencia	143
2.3.2.2. Equipamiento	143
2.3.2.3. Reactivos	147
2.3.2.4. Optimización	147
2.3.2.5. Diseño del juego de muestras de calibración	150
2.3.2.6. Diseño de los juegos de muestras de validación	150
2.3.3. Resultados	151
2.3.4. Discusión	156
2.3.5. Conclusiones	157
2.4. Determinación de permetrina e imidacloprid en preparados farmacéuticos de uso veterinario	158
2.4.1. Permetrina e imidacloprid. Características y antecedentes analíticos	158
2.4.2. Método analítico	159
2.4.2.1. Equipamiento	159
2.4.2.2. Reactivos	159
2.4.2.3. Diseño de los juegos de muestras de calibración	160
2.4.2.4. Diseño de los juegos de muestras de validación	161
2.4.3. Resultados	161
2.4.4. Conclusiones	169
<i>Capítulo 3. Resumen y Conclusiones</i>	170
<i>Capítulo 4. Referencias Bibliográficas</i>	180

---

---

 ÍNDICE DE FIGURAS
 

---

	Descripción de contenidos	Página
Figura 1.1	Diseño experimental para 2 factores a 2 niveles	26
Figura 1.2	Optimización por el método simplex	30
Figura 1.3	Superficie de respuesta tridimensional y su gráfica de contorno	31
Figura 1.4	Diseños Central Compuestos. Derecha: para dos factores, donde los puntos situados a una distancia $\alpha$ del centro conforman una estrella; izquierda: para tres factores, donde los niveles están indicados sólo para $x_1$	35
Figura 1.5	Diseño Central Compuesto centrado en las caras para $k=3$	35
Figura 1.6	Diseño de Box-Behnken para tres factores	36
Figura 1.7	Diseños de red simplex para $k=3$ y $k=4$ componentes	37
Figura 1.8	Diseños de centroide simplex para $k=3$ (a) y $k=4$ (b) componentes	38
Figura 1.9	Relaciones posibles entre las cantidades encontradas y las adicionadas (a) Ausencia de error sistemático, (b) Error sistemático constante, (c) Error sistemático constante y proporcional, (d) Error sistemático proporcional	56
Figura 1.10	Experimento de adición estándar. (a) Curva de Adición Estándar, (b) y (c) curvas de calibrado con estándares acuosos	57
Figura 1.11	Representación visual de las diferencias absolutas entre replicados para uno de los métodos	59
Figura 1.12	Gráficos de Bland y Altman para diferentes situaciones: a) no se observa ninguna tendencia, b) se observa la existencia de un error sistemático constante, c) se observa la existencia de error sistemático proporcional, d) se observa heterocedasticidad	59
Figura 1.13	Diferentes situaciones para Gráficos de residuos: a) Comportamiento lineal, b) No hay homocedasticidad, c) Comportamiento no lineal, d) Comportamiento lineal con alta incertidumbre en la concentración de los patrones	64
Figura 1.14	Datos de orden cero. Una muestra genera un solo dato, y el conjunto de calibración resulta un vector que contiene las medidas para las $l$ muestras de calibración	75

---

	Descripción de contenidos	Página
Figura 1.15	Curva de calibrado, a cada valor de concentración le corresponde un dato de absorbancia	75
Figura 1.16	Datos de orden uno. Cada muestra genera un vector de datos, por ejemplo una muestra medida a $J$ longitudes de onda. El conjunto de $I$ muestras de calibración genera una matriz de $J \times I$	76
Figura 1.17	Espectro de absorbancia de un analito, a una determinada concentración	76
Figura 1.18	Datos de segundo orden donde cada muestra genera una matriz de datos, y el conjunto de calibración resulta un arreglo de tres vías	77
Figura 1.19	Respuesta de segundo orden obtenida con un espectrofotómetro con arreglo de diodos y gradiente de pH generado mediante un sistema en flujo (Marsili, 2004; Marsili, 2005)	78
Figura 1.20	Representación esquemática de datos de tercer orden, adquiridos para una sola muestra. Mediante la técnica de fluorescencia puede obtenerse una matriz de excitación-emisión resuelta en el tiempo	78
Figura 1.21	Grafico <i>PRESS</i> vs. $A$ . Puede observarse que el menor <i>PRESS</i> corresponde a $A = 3$ , pero para $A = 2$ se cumple que la probabilidad de $F_2$ es menor de 0,75, por lo que el número de factores que se elige es 2	91
Figura 1.22	Diagrama de flujo que muestra la transferencia de la información durante la etapa de predicción en PCR y PLS.	97
Figura 1.23	Diagrama de flujo de los algoritmos PCR y PLS no lineal durante la etapa de predicción	97
Figura 1.24	Representación esquemática de una unidad de activación o neurona	99
Figura 1.25	Representación gráfica de tres tipos de funciones para activación de unidades	100
Figura 1.26	Representación gráfica de una red multicapa con retroalimentación.	102
Figura 1.27	Representación gráfica de la evolución típica de los errores de calibración y monitoreo en función del número de iteraciones	104
Figura 2.1	Superficie de respuesta estimada con un diseño factorial completo ( $3^2$ ) para tiempo de calcinación (Factor A) y cantidad de solución de cloruro de magnesio (Factor B)	111

	Descripción de contenidos	Página
Figura 2.2	Gráfica de contorno correspondiente la Figura 2.1	112
Figura 2.3	Pantalla del programa MULTIVAR	119
Figura 2.4	Espectros de absorción electrónica en solución acuosa para: dexametasona (8.0 mg l <sup>-1</sup> (rojo)), creatinina (12.8 mg l <sup>-1</sup> (negro)) y propilparabeno (2.7 mg l <sup>-1</sup> (blanco))	123
Figura 2.5	Región elíptica de confianza conjunta para la pendiente y la ordenada al origen, para la dexametasona en el juego de muestras de validación número dos	127
Figura 2.6	A: Espectros de dextropropoxifeno (DEX) y dipirona (DIP) en solución acuosa a pH 2.0 (ambos a 10 mg l <sup>-1</sup> ). B: Espectros de dextropropoxifeno (DEX) y dipirona (DIP) en concentraciones iguales a las obtenidas por dilución 1/2500 de la muestra: DEX, 4 mg l <sup>-1</sup> , y DIP, 120 mg l <sup>-1</sup> .	133
Figura 2.7	Gráfica de concentraciones adicionadas vs. predichas obtenidas por PLS-1 para dipirona en el juego de muestras de validación	135
Figura 2.8	Evolución de los errores de calibración y monitoreo en función del número de iteraciones	137
Figura 2.9	Gráfica de concentraciones adicionadas vs. predichas obtenidas por ANNs para dipirona en el juego de muestras de validación	140
Figura 2.10	Pantalla del programa MVC1	144
Figura 2.11	Superficie de respuesta para el modelo cuadrático de Scheffé	149
Figura 2.12	Gráfica de contornos para el diseño de mezclas <i>simplex centroide</i>	149
Figura 2.13	Diseño experimental para el juego de muestras de calibración (cuadrados) y para el juego N° 1 de validación (círculos)	151
Figura 2.14	Espectros de sueros humanos y de soluciones acuosas de CBZ y de CBZ-EP	151
Figura 2.15	(A) Espectros de calibración de orden cero. (B) Espectros de calibración correspondientes a la segunda derivada	152
Figura 2.16	Región elíptica de confianza conjunta para la pendiente ( <i>b</i> ) y para la ordenada al origen ( <i>a</i> ), correspondiente al análisis por regresión de las concentraciones adicionadas vs. las concentraciones predichas de CBZ. La marca en forma de cruz corresponde al punto teórico ( <i>a</i> = 0, <i>b</i> = 1)	155

	Descripción de contenidos	Página
Figura 2.17	Espectros correspondientes a la permetrina (azul) y el imidacoprid (rojo), en concentraciones iguales a 20 mg l <sup>-1</sup> (solución metanólica) y espectro para una pipeta pulguicida comercial (dilución 1/10000 en metanol) conteniendo ambos componentes (negro)	162
Figura 2.18	Espectros de absorción obtenidos entre 200 y 350 nm para el juego de muestras de calibración	165
Figura 2.19	Espectros de absorción obtenidos entre 200 y 350 nm para el juego de muestras de validación	166
Figura 2.20	Región elíptica de confianza conjunta para la pendiente ( <i>b</i> ) y para la ordenada al origen ( <i>a</i> ), correspondiente al análisis por regresión de las concentraciones adicionadas vs. las concentraciones predichas para permetrina. La marca en forma de cruz corresponde al punto teórico ( <i>a</i> = 0, <i>b</i> = 1)	167
Figura 2.21	Región elíptica de confianza conjunta para la pendiente ( <i>b</i> ) y para la ordenada al origen ( <i>a</i> ), correspondiente al análisis por regresión de las concentraciones adicionadas vs. las concentraciones predichas para imidacloprid. La marca en forma de cruz corresponde al punto teórico ( <i>a</i> = 0, <i>b</i> = 1)	168

---

 ÍNDICE DE TABLAS
 

---

	Descripción de contenidos	Página
Tabla 1.1	Métodos analíticos oficiales para el análisis de medicamentos	15
Tabla 1.2	Matriz de experimentos para un diseño factorial completo 2 <sup>2</sup>	25
Tabla 1.3	Formato para la presentación de los datos provenientes de la comparación de métodos	58
Tabla 1.4	Clasificación de los métodos de calibración multivariada, de acuerdo al orden del instrumento	79
Tabla 2.1	Análisis de los efectos con un diseño Plackett-Burman.	109
Tabla 2.2	Diseño factorial completo a tres niveles para aplicar la metodología de superficie de respuesta	110
Tabla 2.3	Resultados obtenidos en muestras comerciales en un estudio de precisión realizado durante tres semanas consecutivas	113
Tabla 2.4	Análisis comparativo con el método cromatográfico propuesto la USP. Resultados obtenidos sobre cuatro muestras comerciales mediante aplicación de ambos métodos.	114
Tabla 2.5	Composición del juego de muestras de calibración de acuerdo a un diseño central compuesto para la aplicación del método PLS-1	121
Tabla 2.6	Composición del juego número uno de muestras de validación	122
Tabla 2.7	Número óptimo de factores, región espectral óptima y parámetros estadísticos indicadores de la calidad del ajuste realizado con PLS-1	124
Tabla 2.8	Resultados del análisis por PLS-1 para dexametasona en el juego de muestras de validación número uno	125
Tabla 2.9	Resultados del análisis por PLS-1 para creatinina y propilparabeno en el juego de muestras de validación número uno	125
Tabla 2.10	Resultados del análisis por PLS-1 para dexametasona en el juego de muestras de validación número dos y en una muestra comercial del inyectable	126
Tabla 2.11	Composición del juego de muestras de calibración para los métodos: PLS-1, NL-PLS, SPL-PLS y ANNs	132

---

	Descripción de contenidos	Página
Tabla 2.12	Composición del juego de muestras de validación para los métodos: PLS-1, NL-PLS, SPL-PLS y ANNs	132
Tabla 2.13	Datos correspondientes a la calibración del modelo PLS-1	134
Tabla 2.14	Datos correspondientes a la calibración de ANN	137
Tabla 2.15	Resultados obtenidos para dipirona por aplicación de PLS-1, NL-PLS, SPL-PLS y ANNs al juego de muestras de validación y a muestras comerciales	138
Tabla 2.16	Resultados obtenidos para dextropropoxifeno por aplicación de PLS-1, NL-PLS, SPL-PLS y ANNs al juego de muestras de validación y a muestras comerciales	139
Tabla 2.17	Diseño experimental usado para la optimización del paso de extracción	148
Tabla 2.18	Región espectral, número de factores y parámetros estadísticos correspondientes a ambos modelos PLS-1	153
Tabla 2.19	Resultados obtenidos por aplicación de ambos modelos de PLS-1 al juego de validación N° 1	153
Tabla 2.20	Resultados del estudio de precisión	154
Tabla 2.21	Resultados obtenidos para el estudio de recuperación realizado con el juego de validación número 3	154
Tabla 2.22	Estudio comparativo de los resultados obtenidos por aplicación de HPLC o FPIA y PLS-1 sobre muestras reales de pacientes	156
Tabla 2.23	Composición del juego de muestras de calibración de acuerdo a un diseño central compuesto para la aplicación del método PLS-1	160
Tabla 2.24	Composición del juego de muestras de validación de acuerdo a un diseño central compuesto	161
Tabla 2.25	Parámetros estadísticos de la calibración por PLS-1 para la permetrina utilizando distintas regiones de trabajo	162
Tabla 2.26	Parámetros estadísticos de la calibración por PLS-1 para el imidacloprid utilizando distintas regiones de trabajo	163

---

	Descripción de contenidos	Página
Tabla 2.27	Resultados obtenidos para permetrina por aplicación de PLS-1 al juego de muestras de validación, utilizando distintas regiones para la calibración	163
Tabla 2.28	Resultados obtenidos para imidacloprid por aplicación de PLS-1 al juego de muestras de validación, utilizando distintas regiones para la calibración	164
Tabla 2.29	Parámetros de calibración y cifras de mérito obtenidos para la calibración con PLS-1, cuando se trabaja con el rango completo de sensores	166
Tabla 2.30	Resultados obtenidos en las pipetas comerciales marca Zoovet para ambos ingredientes activos	168

---