

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

**VALIDACIÓN DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE MATERIA PRIMA POR
ESPECTROMETRÍA INFRARROJO CERCANO**



Trabajo de investigación presentado por

Fabiola Lissette Juárez Montoya

Para optar al grado de

Licenciada en Química Farmacéutica

Guatemala
Noviembre 2003

**VALIDACIÓN DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE MATERIA PRIMA POR
ESPECTROMETRÍA INFRARROJO CERCANO**

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

VALIDACIÓN DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE MATERIA PRIMA POR
ESPECTROMETRÍA INFRARROJO CERCANO

BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Trabajo de investigación presentado por

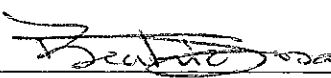
Fabiola Lissette Juárez Montoya

Para optar al grado de

Licenciada en Química Farmacéutica

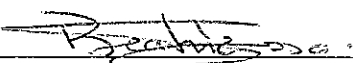
Guatemala
Noviembre 2003

Vo.Bo.


(f) 
Licenciada Beatriz Sosa de Laparra
Asesora

(f) 
Licenciado Oscar Monzón
Asesor

Tribunal

(f) 
Licenciada Beatriz Sosa de Laparra
Asesora

(f) 
Licenciado Oscar Monzón
Asesor

(f) 
Licenciado Eliego Rolando López
Director de Departamento de Química Farmacéutica
Universidad del Valle de Guatemala

Fecha de aprobación: 6 de Noviembre 2003

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE DIAGRAMAS	xi
LISTA DE TABLAS	xii
I. RESUMEN	xiv
II. INTRODUCCIÓN	1
III. MARCO CONCEPTUAL	2
A. Antecedentes del problema	2
B. Justificación	3
C. Planteamiento del problema	4
D. Alcance y límites del problema	4
1. Alcance	4
2. Límites	5
IV. MARCO TEÓRICO	6
A. Espectrometría Infrarrojo Cercano - NIR	6
1. Generalidades de la espectrometría	6
2. Espectrometría Infrarrojo	7
3. Espectrometría Infrarrojo Cercano	9
a. Factores que afectan la obtención de espectros en la región Infrarrojo Cercano	12
4. Equipo para trabajo en Infrarrojo Cercano	13
a. Espectrómetro Infrarrojo Cercano Brucker Vector 22/N	15
B. Validación de un método de identificación NIR	18
1. Requerimientos para la validación	19
2. Etapas para el desarrollo de un método cualitativo NIR	23
a. Estudio de factibilidad	23
1) Factibilidad de la utilización, obtención y medición de las muestras	24

	Página
a. Medición y tipos de muestras	24
b. Desarrollo de la librería	26
c. Validación de la librería	30
d. Validación interna y externa	33
e. Uso rutinario	33
f. Mantenimiento de la librería	34
V. MARCO METODOLÓGICO	36
A. OBJETIVOS	36
1. Generales	
2. Específicos	
B. HIPÓTESIS	36
C. VARIABLES	37
1. Independientes	
2. Dependientes	
D. POBLACIÓN Y MUESTRA	37
1. Universo de trabajo	
2. Muestra	
E. PROCEDIMIENTO	38
F. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	39
G. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	40
VI. MARCO OPERATIVO	42
A. RECABACIÓN Y TRATAMIENTO DE DATOS	42
B. RECURSOS	42
1. Recursos humanos	
2. Recursos materiales	
VII. RESULTADOS	44
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	49

	Página
IX. CONCLUSIONES	53
X. RECOMENDACIONES	55
XI. REFERENCIAS	56
XIII. ANEXOS	58
1. Generalidades fisicoquímicas de las moléculas de principios activos que conforman la biblioteca de referencia.	A1
2. Pasos generales para realizar una validación.	A5
3. Espectros NIR de las materias primas incluidas en la biblioteca de referencia.	A7
4. Reportes generados durante la validación de métodos de identificación.	A8

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Ejemplo de una onda de luz.	7
Figura 2: Regiones del espectro electromagnético.	7
Figura 3: Vista externa mostrando la localización de los compartimientos del Espectrómetro infrarrojo Cercano Bruker Vector 22/N.	17

LISTA DE DIAGRAMAS

	Página
Diagrama 1: Actividades para el desarrollo de una librería NIR.	31
Diagrama 2: Acciones a tomar debido a un fallo en NIR.	35
Diagrama 3: Esquematización del proceso de validación.	A5
Diagrama 4: Interrelación de los distintos pasos a lo largo de una validación de procesos.	A6

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Regiones del espectro infrarrojo.	9
Tabla 2: Especificaciones / Configuración básica del sistema óptico del Espectrómetro Bruker Vector 22/N.	16
Tabla 3: Control de cambios.	20
Tabla 4: Requerimientos de validación para métodos NIR.	21
Tabla D1: Posición de los compuestos en la librería de referencia.	44
Tabla D2: Formación de grupos de espectros de la biblioteca de referencia.	44-45
Tabla D3: Rangos de números de onda incluidos en los métodos de identificación.	45
Tabla D4: Lotes incluidos en los promedios para la librería de referencia 1.	46
Tabla D5: Lotes incluidos en los promedios para la librería de referencia 2.	46
Tabla R1: Resultados de la identificación por el método ACTIVOS.	47
Tabla R2: Resultados de la prueba de identificación por el método ACTIVOS-M1.	47
Tabla R3: Resultados de la prueba de identificación por el método ACTIVOS-M2.	47
Tabla R4: Resultados de la prueba de identificación por el método ACTIVOS-M2-2.	47
Tabla R5: Resultados de la prueba de identificación por el método PENTOXIFILINA.	48

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla R6: Resultados de la prueba de identificación por el método ACTIVOS-M3.	48
Tabla R7: Resultados de la prueba de identificación por el método ACTIVOS-M4.	48
Tabla R8: Resultados de la prueba de identificación por el método ACTIVOS2-B2.	48
Tabla R9: Resultados de la prueba de identificación por el método ACTIVOS4-B2.	48

RESUMEN

Se desarrolló la validación prospectiva de metodología analítica para la identificación de diez principios activos, por medio de espectrometría infrarrojo cercano -NIR-.

Inicialmente se presenta una introducción con la descripción teórica de los conceptos básicos de espectrometría, incluyendo sus generalidades y definiciones. Se describen los factores que afectan la obtención de espectros en esta región y el equipo necesario para trabajar en infrarrojo cercano. Se presenta una explicación detallada de los requisitos que se deben cumplir para efectuar la validación de métodos de identificación NIR, y cada etapa del proceso de validación de métodos de identificación NIR, la medición de las muestras, el desarrollo de la librería, la validación y su uso.

En la parte experimental se implementaron pruebas con varios métodos de identificación NIR para determinar cual es el más adecuado para su uso. Se desarrollaron 9 métodos piloto de identificación, entre los cuales el método ACTIVOS4-B2 identifica correctamente todas las muestras, por lo que cumple con el parámetro de especificidad básico para este tipo de metodologías, considerándose éste método válido y confiable. Para desarrollar la biblioteca de referencia se registraron espectros de por lo menos tres lotes de cada principio activo en forma de muestras de retención, los cuales fueron promediados para su comparación con las muestras externas. Los primeros métodos para los que se utilizó esta librería identificaron correctamente sólo 5 principios activos. Se ajustó la cantidad de espectros dentro de los promedios de referencia de cada principio activo, para asegurar que no se obtuvieran falsos negativos, ya que de esta forma se amplió el umbral de aceptación de identificación y la robustez del método.

Se deben incluir más espectros dentro de la biblioteca de referencia, para asegurar que las muestras de materia prima siempre sean identificadas correctamente.

I. INTRODUCCIÓN

En la Industria farmacéutica el control de calidad de materia prima es esencial para asegurar que ésta cumpla con las especificaciones requeridas. Esta etapa influye en la cadena de producción, y la obtención rápida y confiable de resultados facilita la toma de decisiones y hace que todo el proceso sea más eficiente.

La Espectrometría de Infrarrojo Cercano (NIR ó NIRS, por sus siglas en inglés "Near InfraRed Spectroscopy") es una rama especializada de la espectrometría. La ventaja de la espectrometría NIR es la rapidez y exactitud de las mediciones que por lo general pueden realizarse sin destrucción de la muestra (USP 26/ NF 21). Además, los resultados se obtienen en corto tiempo, y los análisis no necesitan de muestreo previo. Debido a su gran cantidad de aplicaciones, puede utilizarse para analizar una amplia gama de materiales.

La totalidad de la región infrarroja del espectro electromagnético se extiende desde 0.8 a 400 μm . Se considera como infrarrojo cercano la región de 0.8 a 2.5 μm (800 a 2500 nm) (USP 26/ NF 21), lo cual equivale a la región de 12500-4200 cm^{-1} . La Espectrometría en Infrarrojo Cercano es una técnica particularmente útil para la identificación de sustancias orgánicas. Aunque los espectros están restringidos a resonancias entre enlaces C-H, N-H, O-H y S-H de las moléculas que componen el material, usualmente éstos proveen un gran contenido de información.

Debido a que no es posible controlar todas las condiciones que afectan la obtención de espectros, la comparación directa del espectro obtenido de la sustancia a ser examinada con respecto al espectro de referencia debe contar con un tratamiento matemático adecuado y validado (PhEur, 1997). Para esta nueva tecnología, la creación y validación de un método de análisis en el cual se utiliza una librería de espectros en NIR, para identificación de principios activos, es un paso principal en su utilización para la evaluación de materia prima, lo cual es un apoyo a los análisis existentes de control de calidad de estos materiales. Antes de su utilización en serie, debe justificarse y comprobarse que el método desarrollado es adecuado para la aplicación establecida.

II. MARCO CONCEPTUAL

A. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

La Espectrometría Infrarrojo Cercano -NIR- se utiliza en agricultura y en la industria alimenticia. En cuanto a la industria farmacéutica esta técnica se desarrolla constantemente, y las compañías farmacéuticas reconocen su gran potencial. Se hace aparente la posibilidad de reemplazar métodos costosos y que consumen mucho tiempo (Traducción libre de Derksen, 1994).

Actualmente en las farmacopeas no se encuentra una descripción detallada de métodos de análisis que involucren Espectrometría en la región Infrarrojo Cercano. Existen muchos estudios en el extranjero que analizan la aplicación de espectrometría NIR para diagnóstico médico y monitoreo de procesos en industrias de manufactura de alimentos y medicamentos.

Su mayor aplicación en la industria farmacéutica es la identificación de materia prima. La espectrometría NIR provee la capacidad de identificar químicamente materia prima en tiempo real, sin necesidad de procesamiento previo de la muestra (Traducción libre de Derksen, 1994).

La primera investigación exitosa fue presentada en 1982, en la cual se demostró que se podía diferenciar entre varios tipos de penicilina con estructuras similares por medio de NIR. En 1984 se introdujo un método para el uso cualitativo de NIR para determinar la identidad de materias primas (Traducción libre de Derksen, 1994). Debido al rápido crecimiento del interés en métodos NIR y su utilización, se desarrolla cada vez más esta área de la Espectrometría Infrarroja en aplicaciones cualitativas y cuantitativas.

En la actualidad, en Guatemala existen trabajos de investigación iniciales en el ámbito de industria, que abordan la validación de métodos con el apoyo de tecnología NIR.

El presente estudio es de utilidad para establecer las bases, en forma sistemática, del desarrollo de métodos de identificación de materiales mediante Espectrometría NIR, para que sean aplicados en la industria nacional, especialmente en la industria farmacéutica, para contribuir con el futuro desarrollo de este tipo de metodologías, como herramienta complementaria en el proceso de control de calidad.

B. JUSTIFICACIÓN

El uso de Espectrometría de Infrarrojo Cercano (NIR), es una herramienta relativamente nueva que puede utilizarse en la industria farmacéutica en todos los pasos de la manufactura de medicamentos. Incluye la identificación y cuantificación de materia prima y/o producto terminado, y la evaluación de varios parámetros durante el proceso de producción. Actualmente, toda la materia prima que ingresa a bodega para su utilización en una planta de producción farmacéutica, la que incluye principios activos y excipientes, debe ser clasificada, muestreada y analizada previamente a su liberación para su posterior uso en el proceso de producción. Las tendencias actuales buscan trabajar los procesos en línea, en los cuales no existe tiempo muerto que le reste eficiencia a los mismos.

En el caso específico de materia prima que ingresa a la bodega, para su posterior uso en el proceso de producción, la identificación que se efectúa mediante equipo con tecnología de espectrometría NIR, hace que las pruebas previas a su liberación se reduzcan. Se requiere obtener una biblioteca de espectros de referencia debidamente validada para asegurar que se diferencian todos los compuestos que serán analizados, y estos espectros se comparan con los espectros de la muestra del material que se analiza. Las ventajas de este método es que se puede realizar el análisis en el lugar de almacenaje y directamente en los recipientes o contenedores del material a analizar, sin necesidad de muestreo, obteniendo los resultados en tiempo real, sin preparación de muestras o estándares, ni destrucción de la misma.

Estas ventajas y aplicaciones hacen que el desarrollo y validación de una librería de espectros sea parte importante en el mejoramiento del sistema de control de calidad de materia prima, ya que se asegura un análisis rápido y exacto, que disminuye costos y tiempo en el proceso de manufactura de productos farmacéuticos.

C. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los estándares de calidad dentro de la industria farmacéutica son cada vez más exigentes, por lo que el desarrollo y la validación de nuevos métodos que contribuyan a realizar un control de calidad más eficiente es muy importante.

El análisis rutinario de materia prima, tanto de principios activos como excipientes utilizados para la fabricación de medicamentos, asegura que el producto final sea de calidad. Por lo tanto, los nuevos métodos desarrollados para realizar el control de calidad del material deben proveer resultados exactos y reproducibles, y también ser de fácil realización, para no retrasar los planes de producción de un producto.

Todas estas características son cumplidas por el método de identificación por espectrometría NIR. El problema a resolver es que, antes de poder realizar análisis en serie utilizando esta metodología, la biblioteca de espectros de referencia debe estar conformada y validada adecuadamente para asegurar su correcto desempeño. Después del desarrollo y posterior validación del método basado en la biblioteca de referencia desarrollada, se asegura que de forma práctica, funcional y confiable, se logrará la correcta identificación de principios activos como apoyo al proceso de control de calidad.

D. ALCANCE Y LÍMITES DEL PROBLEMA

1. Alcance. Se validó un método basado en una biblioteca de espectros de referencia para la identificación de 10 principios activos sólidos en polvo, del total que ingresan a la bodega de un laboratorio farmacéutico, los que son analizados para su utilización posterior en procesos de producción.

No se discriminó en cuanto a fecha de producción o tamaño de lote producido. Se consideraron las muestras de retención almacenadas durante los años 1999 al 2003, con fecha de caducidad o reanálisis vigente, y que hayan cumplido con todas las especificaciones de materia prima en los controles de calidad ordinarios.

2. Límites. No se consideraron excipientes de ningún tipo, principios activos líquidos, semisólidos u oleosos.

Para la creación de la biblioteca y su posterior validación se registraron espectros de entre 3 y 8 muestras de retención (aproximadamente 20-40 mg cada uno) por lote, y de tres lotes de cada principio activo.

III. MARCO TEÓRICO

A. Espectrometría Infrarrojo Cercano.

1. Generalidades de la espectrometría. La espectrometría consiste en la medición e interpretación de la señal de radiación electromagnética que es absorbida, dispersada o emitida por átomos, moléculas u otras especies químicas. La absorción o emisión se produce por cambios en los niveles de energía de las especies químicas que interactúan con la radiación, y debido a que cada una de éstas posee estados de energía característicos, la espectrometría puede utilizarse para su identificación (Traducción libre de Willard *et al.*, 1988).

“La radiación electromagnética es una clase de energía que se transmite por el espacio a enormes velocidades”. Dos de sus formas más fácilmente reconocibles son la luz y el calor (Skoog y Leary, 1994, Pág. 66).

La luz está compuesta por ondas eléctricas y magnéticas. Estas dos ondas están en un plano perpendicular con respecto a la otra, y la luz se mueve en el espacio en un plano perpendicular a los planos que contienen las ondas eléctricas y magnéticas. El componente de la luz llamado vector eléctrico es el que interactúa con las moléculas. La amplitud del vector eléctrico varía con el tiempo y tiene forma sinusoidal, como se muestra en la figura 1. La *longitud de onda* (λ) de una onda de luz es la distancia entre crestas o valles adyacentes. El *número de onda* (W) está definido como el recíproco de la longitud de onda,

$$W = 1/\lambda \quad (1) \quad (\text{Traducción libre de Smith, 1996})$$

La interacción entre la materia y la radiación ocurre en todo el espectro electromagnético (Traducción libre de Willard *et al.*, 1988). Este abarca un intervalo enorme de longitudes de onda, como se muestra en la figura 2.

El intervalo de radiación electromagnética consiste en un amplio rango que se extiende desde longitudes de onda tan pequeñas como 10^{-9} nm hasta ondas de radio de más de 1000 Km. Entre estos extremos se encuentran de menor a mayor longitud de onda, los rayos gamma, rayos X, rayos ultravioleta (región lejana, media y cercana),

Los fragmentos estructurales dentro de las moléculas, llamados grupos funcionales, tienden a absorber radiación infrarroja en el mismo rango de número de onda. Esto es lo que hace a la espectrometría infrarroja una herramienta de análisis útil (Traducción libre de Smith, 1996).

La espectrometría infrarroja es una herramienta indispensable en la obtención de información estructural de sustancias orgánicas. Su aplicación a sistemas orgánicos se ha realizado tanto en áreas cualitativas como cuantitativas. El análisis cualitativo es, sin duda, su aplicación más utilizada (Traducción libre de Conley, 1972). *"Su principal uso ha sido la identificación de compuestos orgánicos que, por lo general, presentan espectros complejos en el infrarrojo medio"* (Skoog y Leary, 1994, Pág. 296).

Las medidas en el infrarrojo encuentran un uso cada vez mayor en el análisis cuantitativo. En este caso, su elevada selectividad a menudo hace posible la cuantificación de una sustancia en una mezcla compleja, no siendo necesaria una separación previa (Skoog y Leary, 1994).

"La región infrarroja del espectro incluye la radiación con números de onda comprendidos entre los 12,800 y los 10 cm^{-1} , lo que corresponde a longitudes de onda de 0.78 a 1000 μm " (Skoog y Leary, 1994, Pág. 296). De 800 a 2500 nm (0.8 a 2.5 μm) es considerada generalmente como infrarrojo cercano (NIR); de 2.5 a 25 μm (4000 a 400 cm^{-1}) es considerado rango de infrarrojo medio (mid-IR); y de 25 a 400 μm es la región es considerada como infrarrojo lejano (far-IR). A menos que no se especifique de otra forma en la monografía individual, la región de 3800 a 650 cm^{-1} (2.6 a 15 μm) debe ser utilizada para asegurar el cumplimiento con las especificaciones de la monografía en cuanto a absorción IR (USP 26 / NF 21).

Tanto desde el punto de vista de las especificaciones como de los instrumentos, es conveniente subdividir el espectro infrarrojo en estas tres regiones (infrarrojo cercano, medio y lejano), descritas en la tabla #1 (Skoog y Leary, 1994).

El espectro infrarrojo de una sustancia orgánica es característico. Se pueden observar cambios marcados en el espectro cuando la sustancia es contaminada con impurezas, como pueden ser otros compuestos o isómeros. Es debido a esto que la técnica infrarroja es útil para el análisis de materia prima en preparaciones orgánicas a

gran escala, y para monitoreo continuo del avance de procesos (Traducción libre de Conley, 1972).

Tabla #1: Regiones del espectro infrarrojo (Skoog y Leary, 1994, Pág. 297).

Región	Intervalo de longitud de onda (λ), μm	Intervalo de números de onda (ν), cm^{-1}
Cercano	0.78-2.5	12,800-4,000
Medio	2.5-50	4,000-200
Lejano	50-1,000	200-10

Varias características son importantes:

- Las sustancias orgánicas exhiben frecuencias de grupo características en la región infrarroja.
- El espectro de absorción de una sustancia generalmente es específico para dicha sustancia.
- El espectro de absorción de mezcla de compuestos es aditivo, produciendo la suma de los espectros de los componentes individuales.
- La intensidad de una banda de absorción es proporcional a la concentración de la sustancia que absorbe la radiación incidente. (Traducción libre de Conley, 1972)

3. Espectrometría Infrarrojo Cercano. La región NIR del espectro de radiación infrarrojo se extiende desde la longitud de onda mayor de la región visible (770 nm) hasta 2500 nm. Las bandas de absorción en esta región son sobretonos o combinaciones de bandas de tensión vibracional que ocurren en la región de 3000 a 1700 cm^{-1} . Los enlaces químicos mayormente involucrados son C-H, N-H y O-H (Traducción libre de Skoog *et al.*, 1998).

Los espectros moleculares en esta región están dominados por sobretonos y combinaciones de modos de vibración fundamentales, los cuales son mucho más débiles que las vibraciones fundamentales encontradas en la región de IR medio. Dado que la absorción de luz es mucho menor en el rango IR, la radiación típicamente penetra varios milímetros dentro del material, incluyendo sólidos. Además, varios materiales, como por ejemplo el vidrio, son relativamente transparentes en esta región, así que el sistema óptico en los espectrómetros NIR es en comparación robusto y de bajo costo. La tecnología de fibra óptica es implementada fácilmente en el rango IR, lo cual

permite el monitoreo remoto de los procesos en ambientes poco accesibles (USP 26 / NF 21). Debido a que la absorción en el rango de 1 a 3 μm es causada mayormente por sobretonos de la vibración de las moléculas, las bandas de absorción son angostas y bien definidas, aunque las absorptividades molares son menores que en la región visible (Traducción libre de Walton, 1973).

Dos medidas distintas comúnmente realizadas en el rango IR son transmitancia y reflectancia (USP 26 / NF 21).

La **Transmitancia**, o absorción directa de la muestra, mide la disminución en la intensidad de la radiación en función de la longitud de onda, cuando la radiación pasa por la muestra. La muestra, la cual debe ser relativamente transparente a la radiación, se coloca en la ruta óptica del haz de luz entre la fuente y el detector. Este arreglo es análogo al de varios espectrofotómetros convencionales, y los resultados pueden ser presentados directamente en términos de absorbancia (USP 26 / NF 21).

Ya que las fuentes de lámpara de filamento de tungsteno pueden ser altamente estabilizadas, muchos instrumentos NIR poseen un diseño de un solo haz. La intensidad de la radiación de la fuente es escaneada y almacenada. Las muestras son escaneadas y sus absorbancias calculadas con la ayuda de los datos almacenados. En una variación en esta técnica, llamada transflectancia ("transflectance") se coloca un reflector detrás de la muestra para duplicar la longitud de la ruta óptica del haz de luz (USP 26 / NF 21).

Esta configuración puede ser adaptada para compartir la misma geometría del instrumento con sistemas de sonda de fibra óptica o de reflectancia, en los cuales la fuente y el detector están en el mismo lado de la muestra (USP 26 / NF 21).

La **Reflectancia o reflectancia difusa**, mide la razón de la intensidad de la luz reflejada de la muestra, con respecto a la reflejada por el fondo o una superficie reflectiva de referencia (USP 26 / NF 21). En esta técnica, la radiación emitida por la fuente choca contra una muestra en polvo y es reflejada difusamente en distintas direcciones. Esta radiación reflejada es débil, y es medida usualmente por un espectrómetro FT-IR (con transformada de Fourier) (Traducción libre de Colthup *et al.*, 1990).

La radiación NIR penetra una distancia considerable (1-3 mm) dentro de la muestra, donde puede ser absorbida por las combinaciones vibracionales y sobretonos de las especies del analito presentes en la muestra. La radiación no absorbida es reflejada de vuelta por la muestra. Una gráfica de la reflectancia en función de la longitud de onda en la región NIR, exhibe bandas de baja reflectancia donde la absorción de luz ha ocurrido. En varios casos, las bandas espectrales cumplen con la ley de Beer con respecto a la concentración de los componentes en la mezcla. La ley de Beer puede no cumplirse para todas las mezclas sólidas analizadas por reflectancia NIR, pero si se obtienen curvas de calibración, se puede llevar a cabo trabajo cuantitativo (USP 26 / NF 21).

Los espectros en reflectancia NIR son tratados típicamente en la misma forma que los espectros de absorción convencionales, al calcular y graficar $\log(1/r)$ con respecto a la longitud de onda. En analogía a la espectrofotometría de transmitancia convencional, esta forma logarítmica es comúnmente llamada "absorbancia". A pesar de esto, el espectro de fondo puede diferir sustancialmente del espectro de la muestra. Por lo tanto, bandas no lineales, absorbancias negativas, o áreas en que la absorbancia excede el rango dinámico del aparato pueden aparecer. La mayoría de espectros de reflectancia NIR son obtenidos de muestras como polvos o sólidos comprimidos heterogéneos, por ejemplo tabletas. Los sólidos exhiben típicamente un aumento significativo en la absorbancia al acercarse a longitudes de onda mayores (USP 26 / NF 21).

La espectrometría de reflectancia NIR es una herramienta importante para la determinación cuantitativa rutinaria de los constituyentes en polvos finos (Traducción libre de Skoog *et al.*, 1998). Las variaciones en el tamaño de partícula, forma, compactación y otras diferencias físicas entre las muestras pueden causar diferencias en las líneas de base espectrales y por lo tanto interferir con la cuantificación. Se encuentran disponibles técnicas matemáticas para reducir o eliminar la dependencia del tamaño de partícula. El procedimiento más común consiste en obtener la primera o segunda derivada del espectro. Las derivadas son prácticas en la región NIR debido al poco ruido y alta precisión espectrométrica. El espectro de absorbancia corregido puede ser utilizado posteriormente para la cuantificación. En análisis farmacéuticos, la información sobre el tamaño de partícula puede ser importante en lo que se refiere a la

seguridad y efectividad del producto. Por lo tanto, las técnicas que buscan eliminar los efectos del tamaño de partícula en la técnica por reflectancia NIR son aplicadas en cada situación particular (USP 26 / NF 21).

a. Factores que afectan la toma de espectros en la región Infrarrojo Cercano.

1) Temperatura de la muestra. Este parámetro es muy importante en soluciones, especialmente acuosas, en las que una diferencia de pocos grados centígrados puede provocar cambios sustanciales. Parece que es menos crítico para sólidos pero puede ser necesario considerarlo para trabajos exactos. Si la temperatura de la muestra no puede ser controlada, entonces debe ser medida y anotada. Estos datos luego pueden utilizarse para determinar si la temperatura de la muestra afecta los resultados, y si lo hace, se puede formular una corrección que se ajuste a los efectos de la temperatura (USP 26 / NF 21).

2) Solventes y humedad residual. La humedad absorbida, y el agua de hidratación, contribuyen a las bandas en la región NIR. Métodos NIR para la determinación de humedad han sido desarrollados. Es importante mantener un ambiente con humedad consistente para muestras que se ven afectadas por ésta. Este problema puede evitarse si las muestras se mantienen y analizan directamente en recipientes sellados. Otros solventes residuales también pueden contribuir con el espectro obtenido (USP 26 / NF 21).

3) Grosor de la muestra. Ya que la radiación NIR es absorbida mucho menos que la de IR medio, la luz puede penetrar varios milímetros en la muestra. Es importante utilizar métodos que aseguren una ruta del haz de luz consistente. Para lograr esto, la muestra debe ser "infinitamente" gruesa, o cuando son muestras más delgadas de grosor constante deben tener un material de fondo estable de reflexión difusa, de reflectividad constante y que sea de preferencia alta. En medidas de reflectancia, es preferible utilizar muestras que sean infinitamente gruesas a todas las longitudes de onda. Las mediciones de muestras de varias profundidades deben demostrar que su espectro no cambia para profundidades distintas a la escogida para las mediciones (USP 26 / NF 21).

4) Propiedades ópticas de la muestra. Para sólidos, las propiedades de dispersión ("scattering"), tanto de las superficies como de toda la muestra, deben ser consideradas para estándares y muestras analíticas. Los espectros de muestras física, química u ópticamente heterogéneas pueden requerir un promedio de las muestras al incrementar el tamaño del haz o al analizar varias muestras. Algunos factores, como los grados de diferencia en la compactación de la muestra de materiales en polvo, pueden causar diferencias espectrales. El grado de brillo del acabado de la superficie de la muestra (por ejemplo, en tabletas recubiertas) puede agregar un componente de reflectancia especular al espectro NIR observado. La reflectancia especular puede distorsionar los picos de absorción de reflectancia difusa y por lo tanto puede interferir con la cuantificación (USP 26 / NF 21).

5) Polimorfismo. Ya que la reflectancia en NIR puede ser medida directamente de sustancias sólidas cristalinas, la variación en la estructura cristalina (polimorfismo) tiene influencia sobre el espectro. Por lo tanto, los sólidos polimorfos y amorfos pueden distinguirse unos de otros por medio de su espectro NIR (USP 26 / NF 21).

6) Tiempo desde la fabricación o de almacenamiento de las muestras. Las propiedades químicas, físicas u ópticas de algunas muestras pueden cambiar a lo largo del tiempo. Se debe tener cuidado para asegurar que las muestras para análisis NIR son representativas de aquellas utilizadas en la calibración (USP 26 / NF 21).

4. Equipo para trabajo en Infrarrojo Cercano. Todas las mediciones con NIR están basadas en el paso de la radiación luminosa a través o dentro de la muestra, y la medición de la atenuación del haz emergente (transmitido o reflejado) (USP 26 / NF 21).

Existen variedad de espectrofotómetros y espectrómetros basados en distintos tipos de operación. Los aparatos dispersivos incluyen espectrofotómetros de rango extendido UV-VIS de doble haz, espectrómetros de escaneo rápido de un haz con rejilla, y espectrómetros con arreglo de diodos. Espectrómetros IR con Transformada de Fourier de rango extendido también están disponibles. Los materiales más comúnmente utilizados para detector son silicón, sulfuro de plomo, o indio-galio-arsénico. Algunas de las formas de manejo de muestras más comunes son cubetas para muestra, sondas de fibra óptica, celdas de transmisión, y muestreadores rotatorios o transversales. Muchos

instrumentos NIR están diseñados con procedimientos de calibración incorporados fáciles de utilizar (USP 26 / NF 21).

Por lo tanto, teóricamente, es necesario solamente solicitar que la calibración sea realizada y especificar a qué intervalo de tiempo debe volver a realizarse para mantener un adecuado control de calidad. En la mayoría de los casos de auto calibración se utilizan partes internas especiales del diseño del aparato (USP 26 / NF 21).

Ya que la configuración óptica utilizada en la calibración predefinida puede variar físicamente de aquella utilizada en las medidas analíticas específicas, esta configuración no es necesariamente aplicable a las mediciones analíticas (USP 26 / NF 21).

Los métodos para la calibración interna del instrumento pueden variar dependiendo del fabricante, modelo o versión de software. Por lo tanto, la validación detallada funcional en la que se utiliza un estándar de referencia externo es requerido para demostrar la adecuación del sistema. El uso de estándares de referencia externos no implica omisión de los procedimientos usuales de control de calidad internos; en su lugar se provee de documentación independiente de la habilidad del instrumento de realizar un análisis específico (USP 26 / NF 21).

Las ventajas al utilizar un espectrómetro infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) comparado con uno tradicional son las siguientes (Traducción libre de Robinson, 1995):

- Su única pieza móvil es un espejo.
- El uso de láser provee exactitud de alta frecuencia (0.01 cm^{-1}).
- La reflexión de la luz no afecta la señal en el detector, porque todas las señales están moduladas.
- Puede utilizar un haz de radiación de mayor tamaño, y hace más fácil la recolección de datos.
- Se obtiene una razón señal/ruido mayor.
- La rápida velocidad de escaneo permite el análisis y monitoreo de muestras bajo cambios constantes.
- Se obtienen espectros más complejos.

a. Espectrómetro Infrarrojo Cercano Bruker Vector 22/N.

1) *Descripción y especificaciones.* El espectrómetro IR cercano Bruker Vector 22/N es un aparato compacto y robusto, diseñado para análisis cualitativo / cuantitativo tanto en análisis de laboratorio como durante el proceso de producción (Traducción libre de Bruker Vector 22/N User's Manual, 1996). En la tabla # 2 se muestran las especificaciones y configuración básica del sistema óptico del espectrómetro.

2) *Requerimientos ambientales.* Un ambiente controlado es esencial para el desempeño óptimo del instrumento y su confiabilidad a largo plazo. Los límites de temperatura son de 18-30°C (64-84 °F) y una humedad menor a 70% (sin condensación). Las variaciones de temperatura son críticas para las mediciones a largo plazo; éstas típicamente requieren que las fluctuaciones de temperatura no excedan 1°C/hora y no más de 2°C/día. El espectrómetro Bruker Vector 22/N no requiere abastecimiento de gas de ningún tipo, ni agua para sistema de enfriamiento (Traducción libre de Bruker Vector 22/N User's Manual, 1996).

Las cubiertas del espectrómetro deben estar en su lugar (de forma que cubran el compartimiento principal) todo el tiempo posible, para evitar que polvo u otro material extraño se infiltre. A pesar que el aparato es un sistema robusto, que puede utilizarse en un ambiente de fabricación, debe tenerse cuidado de no colocarlo cerca de fuentes de vibración fuertes (Traducción libre de Bruker Vector 22/N User's Manual, 1996).

3) *Requerimientos de energía.* Los requerimientos eléctricos se adaptan al país en que el espectrómetro será utilizado. La posibilidad utilizada es la siguiente: 120 Voltios (AC) $\pm 5\%$, 1.6 Amperes, fase única (50-60Hz), si la computadora está conectada al mismo circuito, el requerimiento de eléctrico (Watts) será mayor (Traducción libre de Bruker Vector 22/N User's Manual, 1996).

Existen condiciones ambientales eléctricas que se deben evitar para la obtención de datos de mayor calidad e incrementar el tiempo de vida de los componentes (Traducción libre de Bruker Vector 22/N User's Manual, 1996):

- Evitar que el aparato sea colocado cerca de potenciales interferencias inductivas eléctricas, pulsos de alta energía, y fuentes de frecuencias de radio o magnéticas de interferencia.
- Colocar cerca al espectrómetro unidades como motores eléctricos, calentadores, equipo de soldadura, equipo de transmisión de radio, equipo de resonancia magnética nuclear de pulsos, o láser de alto poder puede interferir con la operación del espectrómetro, y puede dañar sus componentes. Asegurar que este tipo de instrumentos no estén conectados en el mismo circuito eléctrico que el espectrómetro.
- Si la confiabilidad del sistema de energía principal es un problema en el área (debido a tormentas eléctricas constantes, apagones, interrupción de la energía), debe colocarse un UPS (aparato que provee energía continua).

Tabla # 2: Especificaciones / Configuración básica del sistema óptico del espectrómetro Bruker Vector 22/N (Traducción libre de Bruker Vector 22/N User's Manual, 1996).

Característica	Descripción
Rango de frecuencia	12,500-5,300 cm^{-1}
Resolución	Mayor a 8 cm^{-1} (apodizado), opción de 2 cm^{-1}
Construcción	Óptica en estructura sellada, desecada, con autoanálisis integrado
Fuente	Fuente NIR enriada con aire (reemplazable por el usuario)
Divisor del Haz (Beamsplitter)	Cuarzo
Detector	Detector de diodo de Ge
Puertos de fibra óptica	Hasta cuatro puertos para fibra óptica.
Interferómetro	Interferómetro mecánico con alineación sólida (no requiere aire comprimido)
Scanner	Tres velocidades de espejo escogidas por computadora con una velocidad de escaneo de 2 espectros/segundo (resolución de 8 cm^{-1})
Electrónica	Estructura óptica controlada por microprocesador con control digital de velocidad, diagnóstico del sistema, chequeo avanzado del sistema, convertidor A/D de 16-bit-100 kHz con rango dinámico de 19 bit, procesador de adquisición (AQP) con 1 megabyte RAM

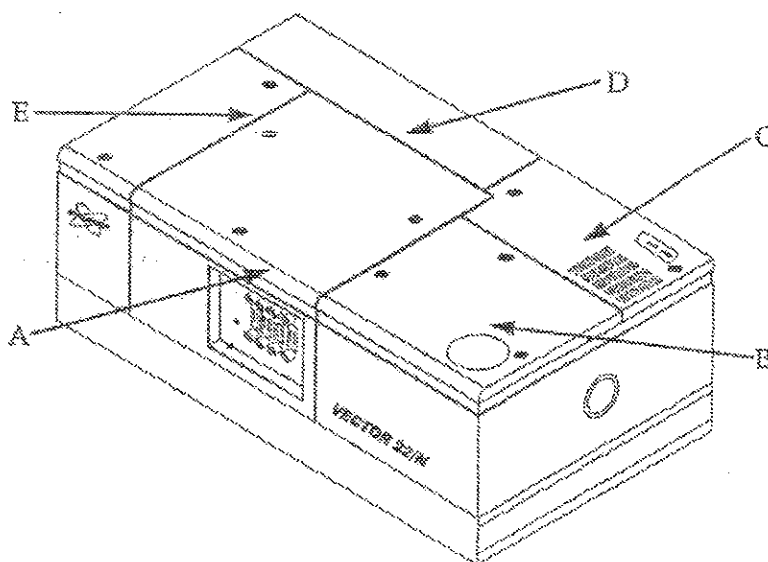
4) *Componentes externos.* El espectrómetro Bruker Vector 22/N posee 5 compartimientos, especificados en la Figura #3 (Traducción libre de Bruker Vector 22/N User's Manual, 1996):

- A. Compartimiento de fibra óptica
- B. Compartimiento del interferómetro
- C. Compartimiento de fuente / electrónica
- D. Compartimiento de adquisición de energía
- E. Compartimiento de electrónica del detector

5) *Mantenimiento* (Traducción libre de Bruker Vector 22/N User's Manual, 1996):

- Precauciones. Antes de efectuar cualquier procedimiento de mantenimiento que involucre abrir compartimientos electrónico o con energía eléctrica se debe desenchufar el equipo. Si el espectrómetro está encendido ("On"), debe tenerse cuidado para evitar observar radiación del láser o tener contacto con voltajes dañinos.

Figura # 3 : Vista externa mostrando la localización de los compartimientos del Espectrómetro Infrarrojo Cercano Bruker Vector 22/N (Bruker Vector 22/N User's Manual, 1996).



- Limpieza de la sonda. Para evitar contaminación cruzada de la muestra, debe limpiarse la sonda después de cada medición. Por lo general, la sonda no necesita ser enjuagada en un solvente después de que una muestra en forma de polvo sea analizada. Una servilleta de papel o material suave es suficiente para remover la mayoría de residuos de polvo.
- Regeneración del desecante. El aire en el compartimiento del interferómetro debe mantenerse seco utilizando un desecante dentro de un cartucho removible. A pesar de que el compartimiento del Interferómetro es mantenido sellado, la regeneración del desecante es necesaria periódicamente. El desecante debe ser regenerado o reemplazado aproximadamente cada 6 meses. Un desecante libre de humedad almacenado en un contenedor sellado es el reemplazo del cartucho instalado en el espectrómetro cuando es necesario.

B. Validación de un método de identificación NIR.

“La validación de métodos analíticos se puede definir como la obtención de pruebas, convenientemente documentadas, que demuestran que un método de control es lo suficientemente fiable para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos” (Escobar, 2001, Pág 16).

“En general se consideran tres tipos de validación (Escobar, 2001, Pág 16):

- *Validación prospectiva, para métodos nuevos.*
- *Validación retrospectiva para métodos repetidamente utilizados, no validados con anterioridad.*
- *Revalidación, que repite parcial o totalmente una validación debido a cambios efectuados en el método validado”.*

“Para validar un método analítico se requiere de un entorno de trabajo que garantice la seguridad de los resultados que se obtengan” (Escobar, 2001, Pág. 17).

Los criterios utilizados en la validación de un método deben ser certeros, seguros y confiables. Cuando se valida un método deben considerarse ciertos criterios típicos

como precisión, exactitud, linealidad, especificidad, límites de cuantificación y detección, aseguramiento de la calidad y rango. También la robustez es un criterio importante, porque garantiza el funcionamiento del método bajo condiciones distintas de otros laboratorios (Pérez, 1997, Pág. 3).

El objetivo de los métodos de identificación en NIR es asegurar, tanto la identidad de un analito en una muestra, o más comúnmente, la identidad de toda la matriz de la muestra, y también asegurar que se realiza la discriminación de un material con respecto a otros materiales. Esto se logra, generalmente, por comparación del espectro NIR (o una transformada del mismo) contra un arreglo de espectros de referencia almacenados en una librería, obtenidos de muestras aprobadas de los materiales relevantes (Traducción libre de PASG, 2001).

1. Requerimientos para la validación. El objetivo del procedimiento analítico debe ser comprendido ya que éste define las características de validación a ser evaluadas. Aunque el rango NIR es conceptualmente distinto a las técnicas analíticas convencionales esta validación es generalmente obtenida a través de el análisis de varios parámetros estadísticos especializados, por medio de transformaciones matemáticas multivariantes ("chemométricas"); aún así éstos pueden estar relacionados con las características de validación fundamental requeridas para cualquier método analítico (Traducción libre de PASG, 2001):

- Especificidad.
- Linealidad.
- Rango.
- Exactitud.
- Precisión.
- Repetibilidad.
- Precisión Intermedia.
- Robustez.
- Límite de detección.
- Límite de cuantificación.

Cada una de éstas características son consideradas las más importantes para la validación de distintos tipos de procedimientos analíticos (ICH Q2A "Text on Validation of

Analytical Procedures"), las cuales aplican en la práctica a los métodos NIR. Esta lista debe ser considerada para cada caso en particular, y la robustez es incluida adicionalmente, y debe ser considerada en el paso apropiado del desarrollo del procedimiento en NIR (Traducción libre de PASG, 2001).

Cambios planificados o no, que puedan afectar el desempeño de un método y requerir re-validación, son más probables en métodos NIR que en métodos analíticos convencionales, especialmente en los métodos cualitativos, donde espectros de lotes pueden ser agregados para mantener la librería al día, y en menor grado a todos los métodos NIR en casos de cambios relevantes a la instrumentación, que no pueden ser controlados con verificaciones del desempeño solamente (Traducción libre de ECA Guidelines, 2001).

De preferencia debe tenerse una prueba apropiada para control de cambios para cada prueba o librería de referencia. Esta prueba debe estar compuesta, por lo menos de dos grupos de estándares (por ejemplo, dos tipos o sustancias) para los cuales la separación es más crítica. Si el método NIR no cumple con la prueba de control de cambios, éste debe ser completamente revalidado. Debe demostrarse que el desempeño de la prueba de control de cambios a lo largo del tiempo es estable (Traducción libre de ECA Guidelines, 2001).

Tabla # 3: Control de cambios (Traducción libre de ECA Guidelines, 2001).

Cambio	Revalidación de la librería	Controles del desempeño del instrumento*	Revalidación del método, o prueba de control de cambios
Cambio a la librería de referencia (agregar o eliminar lotes de sustancias)	Si **	n/a	n/a
Cambios a la instrumentación	n/a		
Software (Nuevo o distinta versión del actual)	--	No	Si
Hardware***	--	Si	Si

* PhEur 2.2.40.

** De acuerdo al tratamiento matemático de análisis hay casos en que la revalidación no es necesaria cuando un material es eliminado de la librería.

*** Componentes ópticos, electrónicos, lámpara; accesorio para la muestra, cambio de lugar, mejoras al instrumento o reemplazo.

n/a No aplica.

La revalidación del método es necesaria en varios casos (Traducción libre de PASG, 2001):

- Cambios en la fabricación de la sustancia.
- Cambios en la composición del producto terminado.
- Cambios en el proceso de manufactura del producto terminado, la fuente o la calidad de los ingredientes.
- Cambios en el procedimiento analítico de la instrumentación NIR.

Tabla # 4: Requerimientos de validación para métodos NIR

(Traducción libre de PASG, 2001).

Parámetro de validación	Comentarios	Tipo de procedimiento			
		Identificación	Calificación	Cuantificación	
Especificidad (a)	---				
Linealidad (b)	1	+	+	+	+
Rango (b)	2	-	-	+	+
Exactitud	3	-	-	+	+
Precisión	4	-(c)	-(c)	+	+
Repetibilidad Precisión intermedia		-	-	+(d)	+(d)
Robustez (e)	5	+	+	+	+
Límite de detección	---	-	-	-	-
Límite de cuantificación	6	-	-	-	+

- Significa que esta característica no es evaluada normalmente.
- + Significa que esta característica sí es evaluada normalmente.

Comentarios (Traducción libre de PASG, 2001):

1. Los datos obtenidos con los espectros de NIR son típicamente multidimensionales. Por lo tanto el equivalente a linealidad en el NIR es el mapeo de una calibración superficie/volumen, no una sola línea de calibración. La validación para NIR involucra por lo tanto la demostración de la correlación de la respuesta de las muestras distribuidas a lo largo del rango definido del modelo de calibración.
2. Definido por la cobertura del producto, variabilidad del proceso y de los materiales, lo cual debe ser introducido en el método NIR.

3. Usualmente demostrado para métodos NIR por medio de la correlación de los resultados de NIR con los datos analíticos de referencia. El NIR está restringido debido a que no hay posibilidad de realizar experimentos de recuperación.
 4. Precisión intermedia: Distintos días y distintos analistas, pero no necesariamente distinto equipo.
 5. La robustez es agregada inherentemente a un método NIR durante su desarrollo por una selección y presentación correcta y apropiada de las muestras, pero aún así debe ser demostrada en forma similar con métodos convencionales.
 6. Restringido por la muestra del menor nivel disponible dentro del grupo de calibración.
- a. La falta de especificidad del procedimiento NIR puede ser compensada por otros procedimientos analíticos de soporte.
 - b. Tanto la linealidad como el rango de un método NIR será dependiente de la disponibilidad de muestras que representen las variaciones de producto y proceso, en contraste al rango fijo (por ejemplo 80-120%), aplicados en la validación de metodologías convencionales.
 - c. No requerido normalmente para métodos de identificación. Para métodos de calificación, la repetibilidad es analizada para demostrar que los umbrales establecidos proveen una discriminación confiable entre materiales aceptables y no aceptables, lo cual difiere a los métodos convencionales.
 - d. En casos en que la reproducibilidad ha sido realizada, la precisión intermedia no es necesaria.
 - e. La robustez no está en la lista de ICH Q2A, ya que para validación de métodos convencionales la robustez es analizada después que el método ha sido desarrollado, y puede no estar incorporada durante el desarrollo del método.

La espectrometría NIR puede ser utilizada tanto para identificación como calificación de materiales. La selección de muestras, y el grado subsiguiente de desarrollo de una librería dependerá de la complejidad de la aplicación (Traducción libre de PASG, 2001).

La **identificación** es utilizada típicamente cuando se requiere solamente la identidad química de material (Traducción libre de PASG, 2001). Está definida como la confirmación de una entidad química específica. En la industria farmacéutica la identificación también incluye la diferenciación entre varias cualidades de una entidad química (por ejemplo, tamaño de partícula, polimorfismo) (Traducción libre de ECA Guidelines, 2001).

La **calificación** se desarrolla por lo general después de que se logra una identificación química, y mide que tan bien una muestra bajo prueba coincide con un modelo del material. Este modelo es derivado de las muestras escogidas para representar la variabilidad aceptable del material. Estas variaciones incluyen humedad,

tamaño de partícula, contenido de solventes, y otras propiedades físicas y químicas. Tanto para identificación como calificación, la diferenciación entre los materiales de la librería debe ser demostrada (Traducción libre de PASG, 2001).

2. Etapas para el desarrollo de un método cualitativo NIR. La identificación o calificación de una sustancia (principio activo, excipiente, mezcla, producto terminado o intermedio), utilizando espectrometría NIR, se basa en la comparación de datos espectrales de esta sustancia con los datos espectrales de varias muestras de varios lotes de las distintas sustancias presentes en una librería de referencia. Generalmente se necesitan métodos de análisis matemático para comparar los datos y obtener conclusiones (coincide, no coincide, ambiguo). En el caso de una conclusión ambigua el método debe ser ajustado de manera que la sustancia sea aprobada o rechazada correctamente, o que se excluyan las sustancias que interfieren con el alcance del método. Las sustancias de interferencia o distintos grados de la misma sustancia pueden clasificarse como un solo material de ser posible (Traducción libre de ECA Guidelines, 2001).

El desarrollo y validación de una aplicación cualitativa típica en NIR incluye los pasos siguientes (Traducción libre de PASG, 2001):

- Selección del equipo.
- Validación del equipo.
- Estudio de factibilidad.
- Selección y presentación de las muestras.
- Desarrollo de la librería.
- Validación de la librería.
- Mantenimiento de la librería y control de cambios.

a. Estudio de factibilidad. Antes del desarrollo del método se recomienda llevar a cabo un estudio inicial de factibilidad, por ejemplo para encontrar los requerimientos óptimos de presentación (rapidez y reproducibilidad), cantidad de muestras y número mínimo de escaneos para lograr análisis eficientes. El conocimiento inicial de la composición y estructura molecular de las muestras de la librería siempre es beneficioso para asegurar que el método NIR es la forma de análisis más adecuada (Traducción libre de PASG, 2001).

1) *Factibilidad de uso, obtención y medición de las muestras.* La selección de las muestras es crítica para el éxito de cualquier aplicación cualitativa. Una estrategia para la selección y medición es necesaria, tomando en cuenta los puntos dados. Se requieren dos juegos de muestras: una para la construcción de la librería y una independiente para la validación. Todas las muestras utilizadas para construir y validar la librería deben tener algún nivel de autenticación, dependiendo de su aplicación específica (Traducción libre de PASG, 2001).

También se deben considerar diferencias de origen de los materiales en la construcción y validación de las librerías. Deben ser recolectados lotes distintos a lo largo de un período de tiempo para cubrir los cambios en concentración, proveedor, cambios en los procesos o variaciones en las condiciones de almacenamiento. Es posible utilizar muestras de retención, si es justificable con respecto a la estabilidad química y física durante el almacenamiento. El número de lotes requeridos para entrenar al sistema dependerán de la complejidad del análisis y deben describir colectivamente las variaciones típicas de la sustancia que está siendo analizada. Asociadas con estos lotes deben haber muestras que están fuera de especificación y/o de distintos lotes muy relacionados. Esto es definido como parte del método de validación (Traducción libre de PASG, 2001).

La identificación requiere normalmente un pequeño número de varios lotes. Un número mayor será necesario para calificación (Traducción libre de PASG, 2001).

a. *Medición y tipos de muestras.* Existen muchos accesorios disponibles para el análisis de muestras en NIR (por ejemplo, copas, viales, sondas de fibra óptica y accesorios para aplicaciones especiales). La elección depende de los requerimientos de uso, y son definidos en la etapa de calificación del diseño. Cada uno de éstos tiene sus ventajas y limitaciones. La presentación de la muestra es una fuente de variación potencial durante la medición de muestras y debe ser lo más consistente y reproducible posible. Variaciones potenciales deben considerarse durante los experimentos de robustez, y ser documentadas claramente (Traducción libre de PASG, 2001).

En la metodología NIR el tamaño de muestra efectivo, generalmente, es significativamente más pequeño que en métodos convencionales, y es muchas veces menor a la dosis unitaria. Esto es debido, no al accesorio de presentación, sino al área de la muestra que es iluminada por el haz de luz NIR. Por lo tanto, debe tenerse en cuenta que el NIR es capaz de detectar heterogeneidad aparente, por lo menos en microescala, y se deben tomar las medidas necesarias para tener esto en consideración. En la mayoría de aplicaciones debe encontrarse alguna forma de promediar las mediciones realizadas sobre un área de muestra mayor; esto puede incluir mover o rotar la muestra por el haz de luz NIR durante el escaneo espectral (Traducción libre de PASG, 2001).

a.1.) Medición por transmisión:

- **Líquidos y soluciones.** Presentaciones comunes incluyen celdas transparentes al infrarrojo cercano de longitud de viaje fija o pares de fibra óptica. La muestra puede ser medida utilizando una longitud de viaje adecuada (0.5-4 mm). Debe evitarse la presencia de burbujas de aire y la temperatura de la muestra debe mantenerse constante lo más posible. Una medición de aire como referencia es requerido para muestras líquidas. Un solvente de referencia puede ser utilizado para muestras en solución (Traducción libre de PASG, 2001).

- **Sólidos.** Muestras de tabletas o polvos pueden ser analizadas por transmisión en un espacio apropiado o una bandeja automatizada. La estructura debe ser tal que minimice errores de posición y dispersión de la luz. Se debe grabar un espectro de referencia apropiado (Traducción libre de PASG, 2001).

a.2.) Medición por reflectancia difusa. Las muestras sólidas pueden ser medidas por reflectancia difusa. La muestra puede ser medida en recipientes como copas o viales desechables, utilizando una sonda para reflectancia ya sea para escaneo directo por inserción en la muestra o escaneo indirecto a través del material de empaque. Tiene que asegurarse un posicionamiento consistente sobre la superficie óptica (Traducción libre de PASG, 2001).

Debe considerarse la densidad del empaque, profundidad del empaque, presión de la sonda, variación de la celda y cobertura de la ventana de detección. Se debe

utilizar un espectro de reflectancia apropiado (por ejemplo de cerámica o Espectralon) (Traducción libre de PASG, 2001).

a.3.) Medición por transflectancia. Muestras líquidas y suspensiones de sólidos pueden ser medidas por transflectancia. Las muestras pueden ser presentadas utilizando un reflector difuso inerte (por ejemplo dióxido de titanio dispersado o una superficie de metal reflectora). Debe evitarse la presencia de burbujas de aire y la temperatura de la muestra debe mantenerse constante lo más posible. Una medición de aire como referencia es requerido para muestras líquidas. Una referencia apropiada dependiendo del método debe ser grabada (Traducción libre de PASG, 2001).

b. Desarrollo de la librería. Una librería cualitativa incorpora los datos de entrenamiento para cada grupo de material, cualquier transformación posterior, y el análisis de discriminación. Estos dependen de la aplicación deseada de la librería. Una vista general de las actividades asociadas con el desarrollo de la librería se muestra en el diagrama 1 (Traducción libre de PASG, 2001).

El desarrollo de una librería cualitativa típica involucra los siguientes pasos (Traducción libre de PASG, 2001):

- Definir el propósito de la librería.
- Seleccionar las muestras y espectros para el grupo de calibración.
- Pre procesamiento y transformación de datos.
- Construcción de la librería.
- Determinación de los umbrales.

b.1.) Definición del propósito de la librería. Es importante definir el alcance de la librería en términos de su aplicación deseada antes de iniciar su desarrollo. Esto puede ser solamente para procesos de identificación o para identificación y calificación. Se debe considerar la similitud estructural y el número de grupos de materiales a ser diferenciados (Traducción libre de PASG, 2001).

b.2.) Selección de muestras y espectros para el grupo de calibración. Los datos espectrales deben ser adquiridos para los grupos de calibración

de acuerdo a lo especificado en la sección de selección / presentación de las muestras (Traducción libre de PASG, 2001).

La variabilidad de la muestra debido a los siguientes factores puede ser incorporada a la librería. Estos factores, entre otros, son importantes, especialmente para la calificación de librerías (Traducción libre de PASG, 2001):

- Humedad.
- Tamaño de partícula.
- Solventes residuales.
- Productos de degradación.
- Cambios en la composición de productos formulados.
- Otras propiedades químicas / físicas.
- Tiempo (cambios en los componentes o el proceso, así como variaciones del instrumento).
- Fuentes alternativas de material.
- Muestras de retención.
- Temperatura (especialmente para líquidos).
- Operador.
- Presentación (por ejemplo inserción de la sonda).
- Variación entre instrumentos.

Estos factores y el grado en que son considerados dependen del alcance del método y las necesidades de diferenciación (Traducción libre de PASG, 2001).

b.3.) Muestra de los datos. Es importante examinar visualmente todos los espectros para verificar la ausencia de anomalías o la presencia de datos aislados ("outliers"). Los datos potenciales aislados deben ser investigados y pueden ser excluidos solamente por razones analíticas válidas, y cualquier exclusión debe ser documentada (Traducción libre de PASG, 2001).

b.4.) Selección del grupo de calibración. Puede ser deseable seleccionar muestras representativas a partir de una población mayor. En el caso más simple, una evaluación visual puede ser suficiente. Para situaciones más

complejas el uso de herramientas para seleccionar las muestras pueden ser útiles (Traducción libre de PASG, 2001).

El número de muestras requeridas para cada grupo de material dependerá del algoritmo de diferenciación utilizado, y la complejidad de la aplicación, por ejemplo la exactitud de la determinación de los límites del grupo (Traducción libre de PASG, 2001).

b.5.) Pre procesamiento y transformación de datos. Muchas veces es necesario un tratamiento matemático de los datos para reducir su complejidad espectral. Por ejemplo, utilizar derivadas o algoritmos de corrección de dispersión puede reducir los resultados fuera de la media debidos a características físicas. El uso de datos sin tratamiento puede ser más aplicable en casos de calificación en que los efectos debidos a la forma física son importantes. Debe tenerse cuidado al realizar transformaciones matemáticas ya que se pueden introducir cambios o perder información esencial. Se requiere la comprensión del algoritmo y en todos los casos la razón para el uso de la transformación debe ser documentado (Traducción libre de PASG, 2001).

b.6.) Construcción de la librería. La estructura de la librería puede depender de las limitaciones del software y el requerimiento de los usuarios. En el caso más simple todos los materiales pueden ser incorporados en una librería. Alternativamente éstos pueden ser divididos en sub librerías para asegurar el nivel de especificidad requerido (Traducción libre de PASG, 2001).

Para cada sustancia para la cual el método se desarrolla, tres o más espectros de por lo menos tres lotes ("training set") deben ser incluidos en la librería de referencia. Las características de estos lotes deben ser verificados con los métodos convencionales incluidos en las especificaciones, y deben representar las variaciones normales en proveedor, parámetros físicos y otros de importancia según el caso (Traducción libre de ECA Guidelines, 2001).

Todos los grupos de materiales en la librería principal deben tener la misma transformación matemática. Las transformaciones deben ser las mismas para cada sub-librería pero pueden ser diferentes entre ellas; por ejemplo, cuando se realiza la calificación del desempeño después de la identificación (como podría ser sub clasificar

grados de lactosa a partir de la librería principal de excipientes) (Traducción libre de PASG, 2001).

Puede utilizarse la totalidad del rango de longitud de onda o uno reducido. Puede requerirse un rango reducido debido a el uso de accesorios de muestreo o la eliminación de datos irrelevantes (por ejemplo, áreas que exceden el rango dinámico, áreas de ruido alto). Segmentos de longitud de onda también pueden ser útiles para remover efectos no deseados o para resaltar diferencias pequeñas pero importantes (Traducción libre de PASG, 2001).

Similar a otras técnicas, el NIR puede no ser capaz de discriminar entre todos los grupos de material, por ejemplo miembros cercanos de una serie homóloga. En estos casos puede ser necesario unir los dos grupos en uno y utilizar otros métodos de control para determinar la identidad / calidad específica de cada material (Traducción libre de PASG, 2001).

- **Selección de algoritmo.** Existen varios algoritmos, dependiendo la elección del usuario, considerando el alcance de la librería. A pesar de esto, es recomendable utilizar el algoritmo más simple disponible, que puede ser definido claramente y provee diferenciación adecuada. Por ejemplo, para propósitos de identificación solamente, en la que no se determinarán factores físicos, utilizar el método de correlación de longitud de onda utilizando la segunda derivada sería suficiente (Traducción libre de PASG, 2001).

b.7.) Determinación de los umbrales. Inicialmente, la validación interna debe ser realizada mediante los valores predeterminados de software, o aquellos recomendados por el fabricante. Los umbrales de la librería pueden ser modificados siguiendo la validación interna de la librería, analizando el desempeño de muestras externas y considerando la mejor coincidencia posible (Traducción libre de PASG, 2001).

Ya que los umbrales se determinaron, la validación interna debe ser repetida para probar que se da una diferenciación aceptable entre distintos grupos manteniendo al mismo tiempo la aceptación de un material a su grupo. Esto puede ser un proceso iterativo (Traducción libre de PASG, 2001).

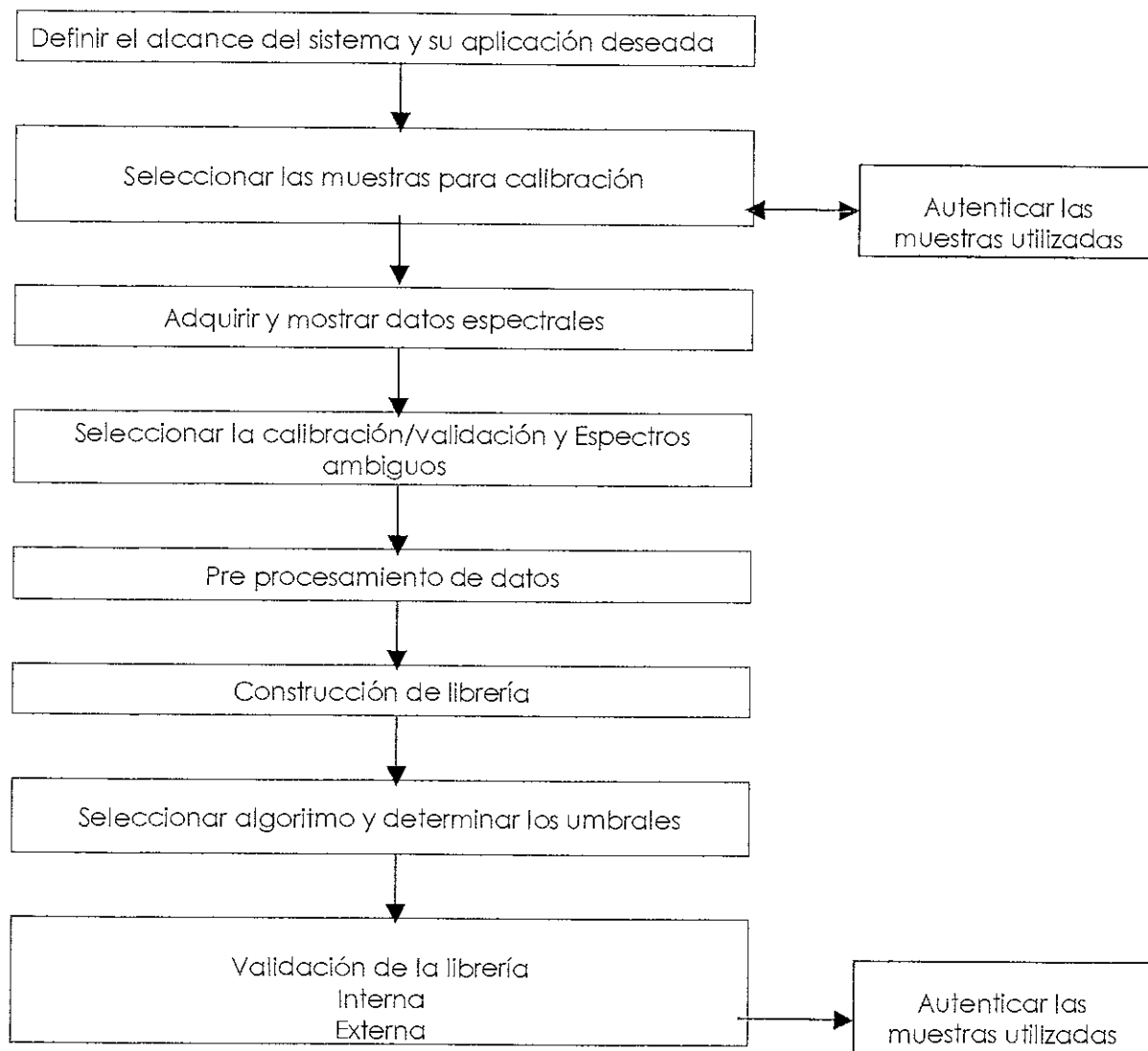
c. Validación de la librería. El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es asegurar que es adecuado para la aplicación propuesta. Esta aplicación debe ser considerada en la determinación de los parámetros de validación requeridos. Cada aplicación debe ser considerada individualmente. Cualquier trabajo prospectivo debe documentarse en un programa de validación. Debe describirse en detalle las pruebas a realizarse y los criterios de aceptación que se aplicarán (Traducción libre de PASG, 2001).

La validación del método debe demostrar que los espectros de un número mínimo aceptable de lotes son incluidos en el grupo de prueba ("training set"), y que estos lotes son lo suficientemente representativos para cubrir la variación normal de la sustancia. La composición de la librería de espectros debe ser descrita con una lista de números de lote. Debe verificarse que los espectros utilizados para crear la librería de referencia fueron aprobados correctamente. La validación de un método NIR cualitativo debe incluir la validación de especificidad y robustez. Después de cada paso de la validación la metodología NIR puede ser ajustada de ser necesario. Ajustes que pueden ser posibles son, el cambio de pre-tratamiento y cambio de umbrales, para excluir sustancias del alcance del método, o clasificar sustancias como una misma (Traducción libre de ECA Guidelines, 2001).

c.1.) Especificidad. El grado de especificidad depende de la aplicación del método NIR. La falta de especificidad del mismo puede ser compensada con otros procedimientos analíticos de soporte (Traducción libre de ECA Guidelines, 2001).

Se le deben presentar "desafíos" potenciales a la base de datos (Traducción libre de PASG, 2001), los cuales deben ser rechazados (Traducción libre de ECA Guidelines, 2001). Estos pueden ser materiales recibidos que son similares a aquellos que se encuentran en la base de datos de forma visual o química, o por nombre. Se debe considerar que hay materiales manufacturados por proveedores externos que pueden ser entregados erróneamente. La profundidad de las pruebas de especificidad depende de la aplicación y el riesgo que está siendo controlado. Muestras independientes del material representado por la librería pero no utilizado para crearla (por ejemplo, distintos lotes o mezclas) deben producir identificación positiva cuando son analizados (Traducción libre de ECA Guidelines, 2001, Traducción libre de PASG, 2001).

Diagrama #1: Actividades para el desarrollo de una Librería NIR (Traducción libre de PASG, 2001).



En el caso de calificar un método, es importante especificar por qué está siendo utilizado, y luego aplicar un "desafío" apropiado, por ejemplo, diferentes grados del mismo material, formas hidratadas/anhidras, varios polimorfos (Traducción libre de PASG, 2001).

Para la identificación o calificación de sustancia farmacéuticas, análogos relevantes en estructura y nombre deben ser incluidos en el proceso de validación externa, a menos que su ausencia se justifique. Esta justificación puede basarse en (Traducción libre de ECA Guidelines, 2001):

- El número de análogos incluidos en vista el número total de análogos relativos (el grupo de validación debe ser lo suficientemente representativo para todo el grupo de análogos existentes).
- Las características NIR espectrales esperadas de los análogos.
- La probabilidad de su presencia en el ambiente farmacéutico de aplicación.

Los resultados de la validación deben demostrar inequívocamente para cada parámetro bajo prueba, que el método NIR desarrollado es suficientemente específico para discriminar entre lotes que cumplen con el parámetro analizado y aquellos que no cumplen, en la misma forma que para el método de referencia (Traducción libre de ECA Guidelines, 2001).

c.2.) Robustez. Los desafíos realizados en esta categoría pueden variar de acuerdo a la aplicación y técnica de muestreo. Esto analiza el efecto de cambios menores en las condiciones normales de operación en el análisis (Traducción libre de PASG, 2001).

Algunos cambios típicos en las condiciones de análisis utilizando espectrometría NIR son (Traducción libre de ECA Guidelines, 2001 y Traducción libre de PASG, 2001):

- Efecto de las condiciones ambientales en el análisis (humedad, temperatura).
- Efecto de la temperatura de la muestra en el análisis.
- Posición de la muestra en la ventana óptica.
- Profundidad de la sonda y compresión/empaque del material.
- Efecto de varios tipos de accesorios de muestreo.
- Influencia del cambio de partes del instrumento (por ejemplo, lámparas).
- Cambios en los parámetros del algoritmo de pre procesamiento y calibración (por ejemplo, segmento de la derivada, distancia del umbral).
- Composición del material de empaque, cuando aplica.

c.3.) Repetibilidad. Esta no es requerida normalmente para los métodos de identificación. Para métodos de calificación, es necesario analizar la repetibilidad para demostrar que los umbrales de aceptación establecidos pueden discriminar entre materiales aceptables y no aceptables, por lo que el enfoque es

distinto para métodos NIR comparados con métodos convencionales (Traducción libre de PASG, 2001).

d. Validación interna y externa.

d.1.) Validación interna. La evaluación del desempeño de la librería se efectúa para cualquier base de datos espectral en construcción. Está basada en las muestras seleccionadas para componer la librería (por ejemplo demostrar que las muestras de la librería pueden ser discriminadas unas de otras). Esto es usualmente realizado por el software. El procedimiento exacto puede variar de acuerdo al software, los pasos básicos son (Traducción libre de PASG, 2001):

- Verificación que los espectros utilizados para crear la librería son identificados correctamente, utilizando el método de coincidencia elegido (por ejemplo correlación o distancia).
- Confirmación que las distribuciones para los materiales en la librería no se sobreponen.
- El uso de validación cruzada en la construcción de la librería.

d.2.) Validación externa. Después de que se logra la validación interna, el desempeño de la base de datos es verificado utilizando muestras autenticadas que no fueron utilizadas para generar la base de datos (Traducción libre de PASG, 2001). La composición del grupo de validación externa debe ser descrito sin ambigüedad y ser justificada (Traducción libre de ECA Guidelines, 2001).

e. Uso rutinario. Todas las operaciones que involucren el uso del NIR deben ser documentadas claramente. Generalmente éstas incluyen (Traducción libre de PASG, 2001):

- Desarrollo y mantenimiento de las librerías (incluyendo adiciones a una librería existente).
- Calibración y mantenimiento del instrumento.
- Calificación continua del desempeño del instrumento.
- Uso rutinario, incluyendo acciones debido a fallas.

El acceso al sistema debe estar controlado para que sólo las funciones requeridas estén disponibles. Esto puede realizarse por medio de control por contraseña. Por ejemplo, un administrador del sistema NIR o analista de desarrollo requieren acceso total al software, mientras que un operador de rutina puede necesitar acceso sólo para realizar un identificación de rutina (Traducción libre de PASG, 2001).

e.1.) Resultados fuera de especificación. Al desarrollar librerías para identificación de espectros, el fin es capturar la mayoría de variaciones naturales aceptables en un material. Ocasionalmente, todas estas variaciones no serán capturadas en el grupo inicial de entrenamiento, y puede haber situaciones en que existan materiales fuera del modelo representado por la librería, resultando en una 'no conformidad en NIR' comparado contra el modelo en NIR. En estas circunstancias es esencial que el material sea autenticado utilizando pruebas alternativas apropiadas, previo a su aceptación e incorporación a la librería. Un procedimiento documentado describiendo este proceso debe estar disponible (Traducción libre de PASG, 2001). En el diagrama #2 se muestran las acciones en general que resultan de un fallo en la identificación por NIR.

f. Mantenimiento de la librería. Se deben aplicar las *Buenas Prácticas de Información Tecnológica* para asegurar que se los controles realizados son adecuados (Traducción libre de PASG, 2001):

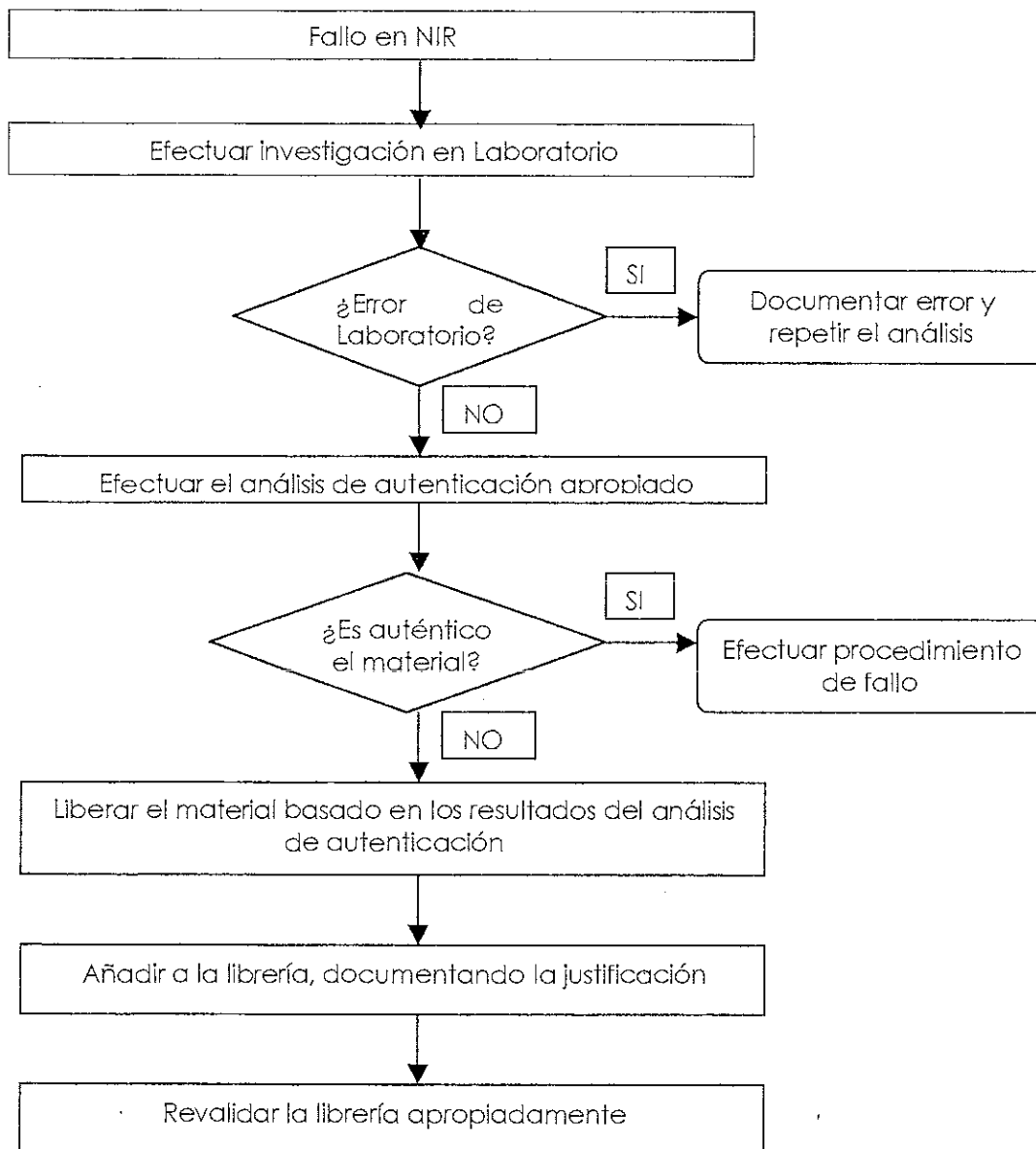
- Se debe crear un archivo de respaldo ("backup") de la base de datos actualizada, y después de cada cambio, para que el sistema de información pueda ser recreado en caso de fallo del hardware o corrupción de la base de datos.
- Una copia de cada versión previa debe estar disponible en caso de que se quiera revisar la base de datos en algún momento.

Bajo condiciones normales no es recomendable que se eliminen materiales de la librería aunque su uso esté discontinuado, ya que su presencia agrega robustez en general a la base de datos de la librería. Algunas ocasiones, puede ser necesario modificar el grupo de muestras para un material en particular, para poder adaptar (Traducción libre de PASG, 2001):

- Cambios en las propiedades físicas del material.
- Cambios de proveedor.
- Cobertura de un mayor rango de características.

En cada caso la autenticidad de la nueva muestra debe ser demostrada con técnicas distintas al NIR antes de incluirlas en la librería. Cuando éstas demuestren ser aceptables, la librería debe ser modificada utilizando los procedimientos de selección de muestras descritos previamente. Luego la totalidad de la librería debe ser revalidada para demostrar continuidad específica (Traducción libre de PASG, 2001).

Diagrama #2: Acciones a tomar si se da un fallo en NIR (Traducción libre de PASG, 2001).



IV. MARCO METODOLÓGICO

A. OBJETIVOS.

1. Generales.

- a) Desarrollar un método basado en tecnología de Espectrometría Infrarrojo Cercano -NIR- para identificación de materia prima (principios activos).
- b) Validar el método de identificación desarrollado para 10 principios activos.

2. Específicos.

- a) Registrar de forma reproducible, exacta y constante, espectros representativos de los 10 principios activos de acuerdo al método determinado.
- b) Crear una biblioteca de espectros de 10 principios activos.
- c) Efectuar los análisis correspondientes para la validación de la biblioteca de espectros recopilada.
- d) Evaluar el desempeño de la biblioteca NIR, y su capacidad de diferenciar entre los espectros de muestras de materia prima (principios activos) y otras muestras problema.

B. HIPÓTESIS.

Es posible identificar principios activos sólidos en polvo por medio de la comparación de su espectro NIR con el espectro de referencia de una biblioteca NIR validada obtenida, mediante un espectrómetro Brucker Vector 22/N, y el Software OPUS NT versión 4.

C. VARIABLES

1. Independientes.

Espectros de referencia de la biblioteca validada, obtenidos a partir de muestras de retención de principios activos.

2. Dependientes.

Resultados de los análisis de espectros de muestras problema de los distintos materiales a analizar; concordancia o no concordancia entre el espectro NIR de la biblioteca de referencia y el obtenido a partir de la muestra.

D. POBLACIÓN Y MUESTRA.

1. Universo de trabajo. 10 principios activos:

- a) Ciclopirox olamina.
- b) Clobenzorex clorhidrato.
- c) Clobazam.
- d) Furosemida.
- e) Glibenclamida.
- f) Loprazolam metansulfonato.
- g) Metamizol sódico.
- h) Pentoxifilina.
- i) Prednicarbato.
- j) Lomifilina.

2. Muestra.

Muestras de retención de entre 3 y 8 lotes de cada uno de los 10 principios activos.

E. PROCEDIMIENTO.

Se efectuó el desarrollo, recopilación, clasificación y validación de una biblioteca de espectros de referencia de materia prima, obtenidos en el rango Infrarrojo Cercano, utilizando el espectrómetro Bruker Vector 22/N con accesorio de pistola con sonda de fibra óptica, y el programa de identificación incluido en el software OPUS NT versión 4.0. Esta biblioteca será utilizada en la identificación de 10 principios activos como parte del proceso de análisis de materia prima, previo a su liberación para su uso por parte de producción.

Para configurar la librería se registró el espectro de por lo menos tres muestras de retención de cada lote, para un total de 10 principios activos. Estos espectros se promediaron y fueron almacenados en la librería de referencia.

Se validó la ejecución de la prueba de identificación utilizando métodos predeterminados basados en los espectros que se encuentran en esta librería de referencia, con el fin de asegurar que pueden ser diferenciados todos los principios activos de interés entre sí. Se utilizó la opción predeterminada del software para crear métodos de identificación y ajustar sus parámetros.

Se realizó la validación externa de la librería de referencia creada, analizando muestras de retención los mismos principios activos que incluye la librería, pero que no pertenecen al mismo lote. Se optimizó cada método preliminar desarrollado, hasta que todos los materiales problema analizados fueron correctamente identificados.

- **Descripción del procedimiento:**

1. Los espectros se registraron por medio del espectrómetro Bruker Vector 22/N manejado desde una computadora por el Software OPUS en su versión para Windows NT, utilizando un "macro" o programa interno predeterminado.

2. Por medio de este macro específico se recolectaron los tres espectros individuales por recipiente de cada material y se calculó su promedio, el que se

almacenó en el disco duro junto con toda la información de la muestra (No. de lote, código de principio activo).

3. Después de obtener los promedios de los espectros de los 10 principios activos, se dividieron en grupos, por medio de una función especial del software OPUS NT llamada "cluster análisis" o dendograma, basado en la similitud entre espectros.

4. Se determinaron los números de onda de cada grupo para la ecuación de separación y se incluyeron y optimizaron los parámetros de las pruebas preliminares para varios métodos de identificación.

5. La validación de la especificidad de los métodos se efectuó mediante el resultado de similitud entre el espectro de la muestra que se analizó y el espectro de referencia de la biblioteca creada, calculado automáticamente por el método de identificación. El umbral de identificación predeterminado por el método define si una muestra es aceptada.

6. Por último, se determinó que el método de identificación NIR aceptó correctamente muestras de los 10 principios activos de interés, por lo que se consideró válido y confiable para su uso.

F. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.

1. Se determinó la información requerida de las muestras.
2. Se seleccionó el material representativo para obtener espectros.
3. Se obtuvieron los espectros de prueba / validación.
4. Se calculó el promedio de espectros de referencia para cada principio activo.
5. Se crearon los espectros de referencia.
6. Se dividieron los materiales en grupos de análisis (dendograma).
7. Se desarrollaron los métodos preliminares de identificación de forma individual.
8. Se asignó un método de separación para cada grupo asignado y un espectro de referencia para cada método de separación específico.
9. Se inició la validación inicial de la librería para cada método preliminar.
10. Se introdujeron más espectros a la librería de referencia de principios activos que no pudieron ser identificados adecuadamente.
11. Se optimizaron los parámetros de identificación.
12. Se inició el ciclo de validación final de la librería, para:

- a) Asegurar la especificidad del método: Cada prueba de identificación para un material dado debe identificar solamente un material (comparación de umbrales).
- b) Asegurar que no se den falsos negativos.
- c) Demostrar que el método es funcional mediante el análisis de cada espectro de prueba para cada materia prima individual, contra su espectro de referencia en cada método de identificación.

G. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todo análisis estadístico fue realizado automáticamente por el software OPUS NT versión 4, al realizar el análisis de identificación.

Se evaluaron los umbrales de separación de cada material con respecto a su espectro de referencia. La ecuación que se utiliza es (Bruker Reference Manual, 1999):

$$\text{Umbral (th)} = \text{Acierto más lejano} + 0.25 (\text{Fallo más cercano} - \text{Acierto más lejano}) \quad [2]$$

Equivalente a:

$$\text{th} = D \text{ max} + 0.25 (Sd) \quad [3]$$

Se aceptará un espectro de prueba (identificación positiva) cuando la distancia entre el centro del umbral de la sustancia A sumado al de la sustancia B (D_{AB}) es mayor que el del umbral de la sustancia A (D_A) sumado a la sustancia B (D_B) (Sacramone, 2003).

Aceptado: $D_{AB} > D_A + D_B$

Rechazado: $D_{AB} < D_A + D_B$

Para calcular los umbrales se utilizan las fórmulas (Sacramone, 2003):

1. Distancia euclidiana.

$$D_{\text{Sample}} = \sqrt{\sum_{i=1}^k (A_{\text{Sample}}(k) - A_{\text{Ref}}(k))^2} \quad [4]$$

2. Umbral.

$$D_T = D_{Sample, max} + \frac{S_O}{4} \quad [5]$$

$$S_O = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n D_{Sample, i}^2}{n-1}} \quad [6]$$

En donde:

D: Distancia.

D_{sample} : Distancia euclidiana de la muestra.

$A_{sample}(k)$: Absorbancia del espectro de la muestra a la longitud de onda k.

$A_{lib}(k)$: Absorbancia del espectro de referencia de la librería a la longitud de onda k.

D_T : Umbral.

S_O : Desviación de las muestras.

V. MARCO OPERATIVO

A. RECABACIÓN Y TRATAMIENTO DE DATOS.

1. Se registraron los espectros de referencia y de validación de cada principio activo por medio de un "macro" o programa interno predeterminado, utilizando el software OPUS NT.

2. Se calculó automáticamente la primera derivada del espectro de absorbancia de la muestra a analizar.

3. Se calcularon los promedios de los espectros procesados por medio de la función de promediado ("averaging") del software, y se ingresaron a la biblioteca de referencia.

4. Cada promedio fue ingresado a uno o varios métodos de identificación preliminares, dentro de los cuales se obtuvo el umbral automáticamente según las especificaciones del método.

5. Se presentaron tres posibilidades:

- a. Si la distancia del espectro de la muestra problema es **menor** que la distancia hasta el umbral obtenido a partir del espectro de referencia, el material es identificado **positivamente**.
- b. Si la distancia del espectro de la muestra problema es **mayor** que la distancia hasta el umbral obtenido a partir del espectro de referencia, el material **es rechazado**.
- c. Si las distancias de los espectros de dos muestras problema distintas son menores que la distancia hasta el umbral obtenido a partir del espectro de referencia, estas pueden ser confundidas.

B. RECURSOS.

1. Recursos humanos:

- Autora: Br. Fabiola Lissette Juárez Montoya
- Asesora: Licda. Beatriz Sosa de Laparra
- Asesor: Lic. Oscar Monzón

- Asesor: Lic. Rolando López
- Auxiliar: Sr. Carlos Menchú
- Referencia: Lic. Angel Sacramone

2. Recursos materiales:

a. Equipo.

- Espectrómetro marca Bruker modelo Vector 22/N con accesorio de sonda de fibra óptica.
- Software OPUS NT Versión 4.0.
- Computadora.
- Impresora.
- Equipo de protección personal: Bata, mascarilla, calzas, reddecilla, guantes, lentes.

b. Materiales y cristalería de laboratorio.

- Beakers de 100, 50 y 30 mL
- Espátula metálica

c. Material que se analizó. *Para la creación de la Biblioteca de referencia:* Muestras de retención de tres a ocho lotes de cada uno de los diez principios activos, las cuales se almacenan en el la Farmacoteca del Laboratorio de Control de Calidad.

Para la validación de los métodos de identificación basados en la Biblioteca de referencia: Espectros de muestras de retención y espectros tomados de materia prima que ingresa a bodega, de los 10 principios activos incluidos en la biblioteca de referencia.

d. Lugar donde se llevó a cabo la investigación. Cuarto de Muestreo de Materiales del Departamento de Control de Calidad de un Laboratorio Farmacéutico Transnacional.

VI. RESULTADOS

Tabla D1: Posición de los compuestos en la librería de referencia.

Posición en la librería	Compuesto	Código de materia prima
1	Ciclopirox olamina	PAG 01
2	Clobazam	PAG 02
3	Clobenzorex	PAG 03
4	Furosemida	PAG 11
5	Glibenclamida	PAG 12
6	Lomifilina	PAG 15
7	Loprazolam metansulfonato	PAG 16
8	Metamizol sódico	PAG 18
9	Pentoxifilina	PAG 21
10	Prednicarbato	PAG 22

Tabla D2: Formación de grupos de espectros de la biblioteca de referencia.

Grupo	Componentes	Método(s) de identificación
1	Ciclopirox olamina Furosemida Lomifilina Loprazolam metansulfonato Pentoxifilina Prednicarbato	ACTIVOS-M1 PENTOXIFILINA
2	Lomifilina Pentoxifilina	ACTIVOS-M3
3	Clobazam Clobenzorex Glibenclamida Metamizol sódico	ACTIVOS-M2 ACTIVOS-M2-2
4	Ciclopirox olamina Furosemida Glibenclamida Loprazolam metansulfonato Metamizol sódico Prednicarbato	MÉTODO 4

Tabla D2: Formación de grupos de espectros de la biblioteca de referencia (continuación).

Grupo	Componentes	Método(s) de identificación
6	Ciclopirox olamina Furosemida Lomifilina Loprazolam metansulfonato Pentoxifilina Prednicarbato Clobazam Clobenzorex Glibenclamida Metamizol sódico	ACTIVOS ACTIVOS2-B2 ACTIVOS4-B2

Tabla D3: Rangos de números de onda incluidos en los métodos de identificación.

Nombre del Método	Rangos de número de onda ($\pm 0.1 \text{ cm}^{-1}$)
ACTIVOS	7498.4 - 4401.0
ACTIVOS-M1	6472.4 - 5492.6 5376.9 - 4401.0
ACTIVOS-M2	6472.4 - 5596.8 5366.2 - 4401.0
ACTIVOS-M2-2	6726.9 - 6391.4 5828.2 - 5658.5 5241.9 - 4852.3 4574.6 - 4435.8
PENTOXIFILINA	6240.9 - 5689.3 4536.0 - 4401.0
ACTIVOS-M3	6210.1 - 5708.6 4748.2 - 4401.0
MÉTODO 4	7166.6 - 4401.0
ACTIVOS2-B2	7166.6 - 4401.0
ACTIVOS4-B2	7166.6 - 4401.0

Tabla D4: Lotes incluidos en los promedios para la librería de referencia 1.

Código PAG	Números de lote
01	02000922, 03000031, 03000414
02	01001213, 02000133, 03000141
03	02000367, 02000793, 02001277
11	03000287, 03000363, 03000580
12	02001103, 03000165, 03000388
15	02000994, 03000100, 03000391
16	02000532, 02001021, 03000309
18	03000530, 03000531, 03000532
21	03000005, 03000163, 03000582
22	02000366, 02000704, 03000008

Tabla D5: Lotes incluidos en los promedios para la librería de referencia 2.

Código PAG	Números de lote
01	02000922, 03000031, 03000414, 01000523, 02000922
02	01001213, 02000133, 03000141, 00000012, 03000658, 99001556, 99002149
03	02000367, 02000793, 02001277, 01001214, 03000659, 03001040
11	03000287, 03000363, 03000580
12	02001103, 03000165, 03000388, 01000524, 01001638, 03000652
15	02000994, 03000100, 03000391, 01000015, 02000414, 02000415
16	02000532, 02001021, 03000309
18	03000530, 03000531, 03000532
21	03000005, 03000163, 03000582, 01001032, 01001170, 03000715, 03000716, 03000975
22	02000366, 02000704, 03000008

Tabla R1: Resultados de la identificación por el método ACTIVOS.

Principio activo analizado	Umbral de identificación	Resultado	Conclusión
Ciclopirox olamina	0.054263	0.046724	Cumple
Clobazam	0.011583	0.014013	No cumple
Clobenzorex	0.025628	0.041200	No cumple
Furosemida	0.015879	0.015944	No cumple
Glibenclamida	0.008672	0.014328	No cumple
Lomifilina	0.025339	0.053246	No cumple
Loprazolam metansulfonato	0.044651	0.042361	Cumple
Metamizol	0.017982	0.017271	Cumple
Pentoxifilina 1	0.022478	0.022082	Cumple
Pentoxifilina 2	0.022478	0.031728	No cumple
Prednicarbato	0.012964	0.009584	Cumple

Cumple = Identificado correctamente.
 No cumple = No identificado.

Tabla R2: Resultados de la prueba de identificación por el método ACTIVOS-M1.

Principio activo analizado	Umbral de identificación	Resultado	Conclusión
Ciclopirox olamina	0.053157	0.044157	Cumple
Furosemida	0.016132	0.015830	Cumple
Lomifilina	0.023704	0.050505	No cumple
Loprazolam metansulfonato	0.044410	0.030972	Cumple
Pentoxifilina	0.021612	0.020802	No cumple
		0.030557	
Prednicarbato	0.016217	0.013995	Cumple

Tabla R3: Resultados de la prueba de identificación por el método ACTIVOS-M2.

Principio activo analizado	Umbral de identificación	Resultado	Conclusión
Clobazam	0.010991	0.013022	No cumple
Clobenzorex	0.025274	0.040855	No cumple
Glibenclamida	0.008352	0.013995	No cumple
Metamizol sódico	0.017266	0.016176	Cumple

Tabla R4: Resultados de la prueba de identificación por el método ACTIVOS-M2-2.

Principio activo analizado	Umbral de identificación	Resultado	Conclusión
Clobazam	0.025598	0.028794	No cumple
Clobenzorex	0.037087	0.055219	No cumple
Glibenclamida	0.007764	0.014899	No cumple
Metamizol sódico	0.018598	0.020906	No cumple

Tabla R5: Resultados de la prueba de identificación por el método PENTOXIFILINA.

Principio activo analizado	Umbral de identificación	Resultado	Conclusión
Pentoxifilina	0.016084	0.015369	No cumple
		0.019221	
Lomifilina	0.020155	0.053746	No cumple

Tabla R6: Resultados de la prueba de identificación por el método ACTIVOS-M3.

Principio activo analizado	Umbral de identificación	Resultado	Conclusión
Lomifilina 1	0.017095	0.041279	No cumple
Lomifilina 2	0.023282	0.049882	No cumple
Pentoxifilina 1	0.014206	0.009014	No cumple
Pentoxifilina 2	0.011337	0.009014	No cumple

Tabla R7: Resultados de la prueba de identificación por el método ACTIVOS-M4.

Principio activo analizado	Umbral de identificación	Resultado	Conclusión
Ciclopirox olamina	0.045942	0.037069	Cumple
Furosemida	0.012487	0.012174	Cumple
Glibenclamida	0.006987	0.013265	No cumple
Loprazolam metansulfonato	0.051250	0.035859	Cumple
Metamizol sódico	0.017267	0.013781	Cumple
Prednicarbato	0.011233	0.007445	Cumple

Tabla R8: Resultados de la prueba de identificación por el método ACTIVOS2-B2*.

Principio activo analizado	Umbral de identificación	Resultado	Conclusión
Ciclopirox olamina	0.020230	0.018208	Cumple
Clobazam	0.040512	0.26686	Cumple
Lomifilina	0.054960	0.043597	Cumple

*No cumple para la Pentoxifilina.

Tabla R9: Resultados de la prueba de identificación por el método ACTIVOS4-B2.

Principio activo analizado	Umbral de identificación	Resultado	Conclusión
Ciclopirox olamina	0.54263	0.46724	Cumple
Clobazam	0.020230	0.018208	Cumple
Clobenzorex	0.040512	0.026686	Cumple
Furosemida	0.016068	0.016016	Cumple
Glibenclamida	0.034994	0.014156	Cumple
Lomifilina	0.054960	0.043597	Cumple
Loprazolam	0.044651	0.032336	Cumple
Metamizol	0.017982	0.017271	Cumple
Pentoxifilina	0.027247	0.020133	Cumple
		0.027247	
Prednicarbato	0.012453	0.009841	Cumple

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se desarrolló un método de identificación NIR que identifica correctamente los 10 principios activos deseados (ver tabla D1). En total se desarrollaron 9 métodos preliminares, cada uno validado individualmente (ver tabla D2). La validación se basó en métodos de identificación desarrollados con los espectros de una librería de referencia en la que se incluyó el promedio de los espectros registrados de cada compuesto (tabla D4). La base de la validación de este tipo de métodos de identificación NIR es la especificidad (Sacramone, 2003).

El método de identificación con mejor desempeño fue ACTIVOS4-B2, logrando la correcta diferenciación e identificación de todos los principios activos. Para lograr obtener resultados consistentes y adecuados se realizaron varios métodos, optimizados por "prueba y error". El parámetro de aceptación o rechazo al analizar el espectro de una muestra con un método de identificación se basó en la inclusión dentro del umbral especificado automáticamente para cada método según las especificaciones. De acuerdo a este parámetro, mientras más cercano a cero es el resultado de concordancia de la muestra ("Hit quality"), obtenido con respecto al espectro de referencia, mayor es la posibilidad que esta sea identificada correctamente.

Por medio del método ACTIVOS, es posible identificar 4 de las 10 muestras de principios activos (tabla R1). Al analizar los espectros de las muestras de Pentoxifilina, se obtienen resultados contradictorios, por lo que éste método no puede ser utilizado en la identificación de éste compuesto. Puede utilizarse para identificar los siguientes principios activos: Ciclopirox olamina, Loprazolam metansulfonato, Metamizol sódico y Prednicarbato.

El método ACTIVOS-M1 identifica adecuadamente solamente 4 de 6 principios activos analizados (tabla R2). Los dos principios activos problema dentro del grupo fueron la Lomifilina y Pentoxifilina. Una muestra de Pentoxifilina fue identificada correctamente y la segunda no, mientras que para la Lomifilina ninguna de las muestras analizadas pudo identificarse correctamente. Este método se considera validado adecuadamente para identificar los 4 principios activos siguientes: Ciclopirox olamina, Furosemida, Loprazolam metansulfonato y Prednicarbato. Se mantienen dentro del

método los espectros de referencia de los compuestos que no pueden ser identificados, para proveer mayor complejidad del sistema.

Las pruebas posteriores realizadas para desarrollar un método para la identificación de la Lomifilina y Pentoxifilina, incluyen el método PENTOXIFILINA. Por medio de este se determinó si los rangos de número de onda incluidos en el método de identificación ACTIVOS-M1 afectan la capacidad de identificación del método en general. Al afinar los rangos de número de onda para incluir mayormente las absorciones significativas de estos dos compuestos (Lomifilina y Pentoxifilina), no se logró una mejora significativa en los resultados, y su aceptación o rechazo. Este método produjo los mismos resultados que el método original ACTIVOS-M1 (tablas R2 y R5), por lo que con la modificación del factor rangos de número de onda, no se disminuye la diferencia entre el umbral de identificación y el resultado obtenido. Este factor es irrelevante cuando son tan pocos espectros los que se incluyen en la biblioteca de referencia, y por el hecho de ser un método cualitativo (no se necesitan absorciones específicas relacionadas con la concentración).

Por medio del método ACTIVOS M-3, se analizó el impacto que tiene la cantidad de espectros de distintos compuestos en los resultados de identificación. Se redujo el número de espectros de referencia, se incluyeron solamente los espectros de la Lomifilina y Pentoxifilina, para determinar si de esta forma se obtiene una identificación satisfactoria, para evitar posibles interferencias de los demás espectros. Con esta variación en el método de identificación tampoco se logró la correcta identificación de ninguno de los dos compuestos. Este método no puede utilizarse para identificar estos principios activos, se comprobó que la disminución de la cantidad de espectros de referencia no mejora significativamente la aceptación de espectro de prueba.

Mediante el método ACTIVOS-M2 no se obtuvieron los resultados esperados, en la identificación de los cuatro principios activos restantes (ver tabla D1). En este caso también se hicieron varias pruebas afinando los rangos de número de onda en una segunda versión ACTIVOS-M2-2. Por medio de ninguno de los dos métodos fue posible identificar correctamente todos los espectros de las muestras de ninguno de los 4 principios activos analizados dentro de éste grupo (tabla R3 y R4). Por medio del método ACTIVOS-M2, se identificó correctamente el espectro de Metamizol sódico.

Ambos métodos fueron descartados para análisis rutinario, debido a su bajo desempeño.

En el método ACTIVOS-M4 se incluyeron los espectros de referencia de los compuestos que lograron ser identificados correctamente por lo métodos descritos anteriormente (Ciclopirox olamina, Furosemida, Glibenclamida, Loprazolam metansulfonato, Metamizol sódico y Prednicarbato). Esta agrupación se hizo de acuerdo a que los espectros incluidos poseen absorciones fuertes y picos significativos que son de utilidad para su diferenciación. De esta forma se determinó si la intensidad de la absorción de una muestra afecta la capacidad de identificación de un método NIR. Cinco de los seis principios activos fueron identificados correctamente, exceptuando la Glibenclamida (ver tabla R7). Se comprueba que la intensidad de absorción no es el único factor en la identificación, pero si influye en la capacidad de identificación de un método.

Se observó que las variaciones entre espectros de distinto lote del mismo compuesto son pequeñas, y por ser estos espectros los que conforman la biblioteca de referencia, los umbrales de aceptación son muy bajos, lo cual produjo falsos negativos en las pruebas de los métodos iniciales. También afecta a estos resultados la poca cantidad de muestras que se incluyen en los promedios de la biblioteca de referencia.

Para optimizar el proceso se desarrolló una segunda biblioteca (B2). Esto se hizo para que con mayor cantidad de muestras y mayor variabilidad entre los lotes de un mismo principio activo, el umbral de identificación se amplié hasta lograr incluir adecuadamente todas las muestras de un mismo compuesto, y que estas muestras puedan ser identificadas correctamente.

Si se incluyen más espectros de un mismo compuesto en el promedio de referencia de la librería para ser incluido en el método, la identificación obtenida es más exacta. No debe haber mucha variabilidad entre lotes, porque pueden presentarse falsos positivos; pero como en este caso, no puede haber tan poca variabilidad, porque se dan falsos negativos. Para solucionar esta situación se aumentó la cantidad de espectros de referencia de los compuestos que no se habían podido identificar.

El método ACTIVOS2-B2 logró la identificación de tres compuestos que anteriormente no habían podido ser identificados correctamente (tabla R8), aunque después de varias pruebas se determinó que aún no se podía identificar las muestras de Pentoxifilina.

Se agregaron tres espectros más al promedio de referencia de Pentoxifilina, y se volvieron a analizar dos muestras. El método ACTIVOS4-B2 identificó correctamente los 10 compuestos que componen la librería de referencia, incluyendo a las muestras de Pentoxifilina. De la misma forma se analizaron todas los demás espectros de las muestras de prueba, y se determinó que se logra identificar adecuadamente todos los compuestos.

Los umbrales de identificación son la base esencial de la validación interna de la librería. En el caso de estos métodos, se logró la identificación de todas las muestras, aunque los umbrales de aceptación aún son muy bajos. Entonces, cuando sea posible, se deben ingresar nuevos espectros de muestras de materia prima a la biblioteca de referencia, para hacer más confiable la identificación.

El método de identificación ACTIVOS4-LIB2 es el más apto para su uso rutinario, como complemento dentro del proceso de control de calidad de principios activos. Este método es considerado la base par el desarrollo y optimización de un método de identificación, en el cual debe incluirse mayor cantidad de espectros de las muestras de interés, para ser incluidas dentro de la librería de referencia y dentro de los espectros de prueba para validación.

VIII. CONCLUSIONES

1. Es posible la identificación de 10 principios activos utilizando una biblioteca de espectros de referencia validada, obtenidos por medio de espectrometría infrarrojo cercano.
2. Se desarrolló y validó metodología analítica NIR para la identificación de 10 principios activos, tomando como base el análisis de especificidad.
3. Se desarrolló el método ACTIVOS-M1 para la identificación de los siguientes compuestos: Ciclopirox olamina, Furosemida, Loprazolam metansulfonato y Prednicarbato.
4. Se validó el método ACTIVOS-M4 para la identificación de los compuestos: Ciclopirox olamina, Furosemida, Loprazolam metansulfonato, Metamizol sódico, Prednicarbato.
5. El método ACTIVOS2-B2 puede ser utilizado para identificar los compuestos: Ciclopirox olamina, Clobazam y Lomifilina.
6. Se validó el método ACTIVOS4-B2, y se determinó que por medio de éste, se identifican correctamente los 10 principios activos de interés.
7. Los umbrales de identificación son optimizados de acuerdo a la cantidad de espectros dentro de un promedio en la biblioteca de referencia, haciendo más robustos los resultados.
8. La poca variabilidad de la composición fisicoquímica de los materiales, y por lo tanto de sus espectros, hace que los umbrales obtenidos sean pequeños y se presenten falsos negativos.

9. Optimizar la cantidad de espectros de referencia y los rangos de número de onda que se incluyen dentro de un método de identificación, no afectan significativamente los resultados de aceptación, en bibliotecas del tamaño de la analizada (10 componentes), para aplicaciones de identificación.

10. El desempeño de la biblioteca NIR desarrollada, y el método ACTIVOS4-B2, es considerado adecuado para su uso, ya que tienen la capacidad para identificar correctamente los 10 principios activos propuestos.

IX. RECOMENDACIONES

- El método de identificación considerado con mejor desempeño es el ACTIVOS4-LIB2, por lo que se considera el más apto para su uso rutinario y optimización.
- De acuerdo a la librería de referencia actual, y el método de identificación ACTIVOS4-B2, cuando se tengan suficientes espectros de nuevas muestras, puede revalidarse la librería para mejorar su desempeño y aumentar su robustez.
- Es posible desarrollar un método de cuantificación de principios activos en materia prima como una prueba adicional de su pureza.
- Basado en los resultados obtenidos en el desarrollo del método para identificar materia prima, puede ser factible el desarrollo de un método para el análisis de excipientes por medio de espectrometría NIR.
- La metodología de identificación desarrollada puede ser utilizada como parte del proceso de control de calidad, como una prueba paralela complementaria a los análisis rutinarios de calidad, por su corto tiempo de análisis y no destrucción de la muestra.

XI. REFERENCIAS

1. **Bruker OPUS NT Getting Started**. Manual, Version 2.0. 1999. Bruker Optik. 34 pp.
2. **Bruker OPUS NT Reference Manual**. Version 2.0. 1999. Bruker Optik GmbH. 212 pp.
3. **Bruker Vector 22/N User's Manual**. 1996. Bruker Analytische Messtechnik GmbH. 66 pp.
4. Colthrup, N.B., Daly, L.H., Wiberley, S.E. 1990. **Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy**. 3a. edición. Academic Press Inc. USA. 547 pp.
5. Concept paper on the Development of a Committee for Proprietary Medicinal Products / Committee for Veterinary Medicinal Products (CPMP/CVMP). **Note for guidance on the use of Near Infrared Spectroscopy by The Pharmaceutical Industry and Data Requirements for New Submissions and Variations**. 2003. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Londres. www.emea.eu.int/pdfs/human/gwp/330301en.pdf.
6. Conley, R. 1972. **Infrared Spectroscopy**. 2ª. Edición. Allyn and Bacon Inc. USA. 355 pp.
7. Derksen, M. 1994. **Near-Infrared Spectroscopy in the Pharmaceutical Industry. Practical Guide. Applications of near-infrared spectroscopy – A review**. <http://leden.tref.nl/~mderksen/review.html>.
8. Escobar, M.R. 2001. **Validación de un método para la cuantificación de penicilina G sódica en aguas residuales de una industria farmacéutica**. Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala. 62 pp.
9. European Pharmacopoeia. 1997. **Near Infrared Spectrometry** in European Pharmacopoeia. 3ª. Edición. 2.2.40 pp. 43-44.
10. **Guideline on General Principles of Process Validation**. 1997. Food & Drug Administration. USA. 14 pp. Versión electrónica: <http://www.fda.gov/cder/guidance/pv.htm>.
11. **Guidelines for the Development and Validation of Near-Infrared Methods in the Pharmaceutical Industry**. 2002. Extraído del Handbook of Vibrational Spectroscopy. John Wiley & Sons Ltd. Chichester. www.interscience.wiley.com/reference.

12. **Guidelines for the Development and Validation on Near Infrared (NIR) Spectroscopic Methods.** 2001. Pharmaceutical Analytical Sciences Group. www.pasg.org.uk/NIRmay01.
13. Pérez, J. 1997. **Desarrollo y validación de un método para el análisis de residuos de plaguicidas organofosforados en agua por cromatografía de gases de alta resolución.** Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala. 245 pp.
14. Robinson, J. 1995. **Undergraduate Instrumental Analysis.** 5a. edición. Marcel Dekker. USA. 858 pp.
15. Sacramone, A. M. **NIR, Near Infrared Spectroscopy: Guatemala NIR Qualification – Training Course.** Aventis Pharma S.A. Guatemala, 2003.
16. Scoseira, E. **Validación de procesos.** 2002. www.infodynamics.com.uy/validacionp.asp.
17. Skoog, D., Holler, J., Nieman, T. 1998. **Principles of Instrumental Analysis.** 5a. edición. Thomson Learning Inc. USA. 849 pp.
18. Skoog, D., Leary, J. 1994. **Análisis Instrumental.** 4a. Edición. McGraw-Hill/Interamericana de España. Madrid. 935 pp.
19. Smith, B.C. 1996. **Fourier Transform Infrared Spectroscopy.** CRC Press. Florida. 202 pp.
20. The Merck Index. 1989. 11a. edición. Merck & Co. Inc. U.S.A.
21. United States Pharmacopeia and National Formulary, USP 26 /NF 21. 2003. The United States Pharmacopeial Convention. E.U.A. Versión electrónica. Capítulos 851 y 1119.
22. Walton, H., Reyes, J. 1973. **Modern Chemical Analysis and Instrumentation.** Marcel Dekker. USA. 351 pp.
23. Willard, H., Merritt, J., Dean, J., Settler Jr, F. 1988. **Instrumental Methods of Analysis.** 7a. edición. Wadsworth Inc. USA. 875 pp.

ANEXOS

ANEXO 1

TABLA I: PROPIEDADES DE LAS MOLÉCULAS QUE CONFORMAN LA BIBLIOTECA DE REFERENCIA.

Nombre común	Nombre químico	Fórmula empírica	Peso molecular (g/mol)	Punto de fusión	Uso
Ciclopirox olamina	6-ciclohexil-1-hidroxi-4-metil-2(1H)-piridinona sal de etanolamina	C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₃	207.28 (como base)	144°C	Agente antimicótico de amplio espectro con leve actividad antimicrobiana.
Clobenzorex clorhidrato	N-[(2-Clorofenil)metil]-alfa-metilbencenetanamina; (+)-N-(o-clorobencil)-alfa-metilfenetilamina; d-N-(1-fenil-2-propil)-2-clorobencilamina	C ₁₆ H ₁₉ Cl ₂ N	259.78 (como base)	182-183°C	Anorexigénico.
Clobazam	7-cloro-1-metil-5-fenil-1H-1,5-benzodiazepin-2,4-(3H,5H)-diona; 1-fenil-5-metil-8-cloro-1,2,4,5-tetrahidro-2,4-dioxo-3H-1,5-benzodiazepina	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	300.74	180-182°C	Ansiolítico.
Furosemida	Acido 5-(aminosulfonil)-4-cloro-2[[2-furanilmetil]amino] benzóico; Acido 4-cloro-N-furfuril-5-sulfamoil antralinico; Acido 4-cloro-N-(2-furilmetil)-5-sulfamoil antralinico	C ₁₂ H ₁₁ ClN ₂ O ₅ S	330.77	206°C	Diurético. Antihipertensivo.
Glibencamida	Gliburida; 5-cloro-N-[2-[4-[[[ciclohexilamino]carbonil]amino]sulfonil]fenil]etil]-2-Metoxibenzamida; 1-[[p-[2-(5-cloro-o-anisamido)etil]fenil]sulfonil]-3-ciclohexilurea; N-[4-(beta-[2-metoxi-5-clorobenzamino)etil]benzosulfonil]-N'-ciclohexilurea	C ₂₃ H ₂₈ ClN ₃ O ₅ S	494.00	169-170°C	Antidiabético. Sulfonilurea de segunda generación con actividad hipoglucemante.
Loprazolam metasulfonato	6-(2-clorofenil)-2,4-dihidro-2-[[4-metil-1-piperazinil]metil]-8-nitro-1H-imidazo-[1,2-alfa][1,4]benzodiazepin-1-ona	C ₂₄ H ₂₅ ClN ₆ O ₆ S	464.91 (como base)	205-210°C	Hipnótico (sustancia controlada).

TABLA I: PROPIEDADES DE LAS MOLÉCULAS QUE CONFORMAN LA BIBLIOTECA DE REFERENCIA (CONTINUACIÓN).

Nombre común	Nombre químico	Fórmula empírica	Peso molecular (g/mol)	Punto de fusión	Uso
Metamizol sódico	Dipirona, Sal sódica monohidratada de Acido [(2,3-dihidro-1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-1H-pirazol-4-yl) metilamino] metansulfónico; Sal sódica de Acido (Antipirinilmetilamino) metansulfónico	$C_{13}H_{16}N_3NaO_4 \cdot H_2O$	351,35	---	Analgésico. Antipirético.
Pentoxifilina	3,7-Dihidro-3,7-dietil-1-(5-oxohexil)-1H-purina-2,6-diona; 1-(5-oxohexil) teobromina	$C_{13}H_{18}N_4O_3$	278,31	105°C	Vasodilatador
Prednicarbato	(11-beta)-17-[(toxicarbonil)oxil]-11-hidroxi-21-(1-oxopropoxy)pregna-1-4-dien-3,20-diona	$C_{27}H_{36}O_8$	488,58	110- 112°C	Antiinflamatorio tópico (glucocorticoide no halogenado)

(Merck Index, 1989)

TABLA II: ESTRUCTURAS MOLECULARES.

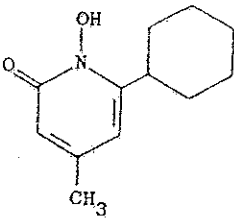
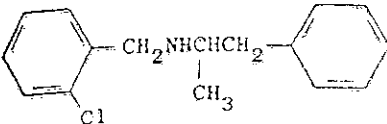
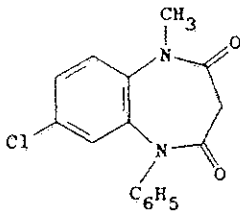
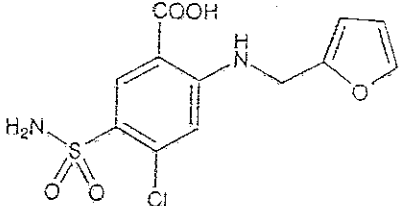
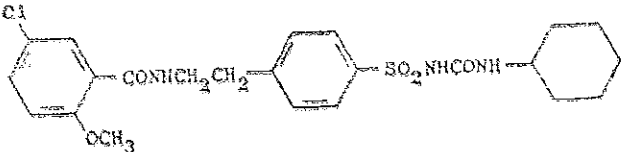
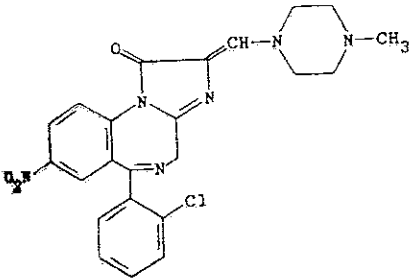
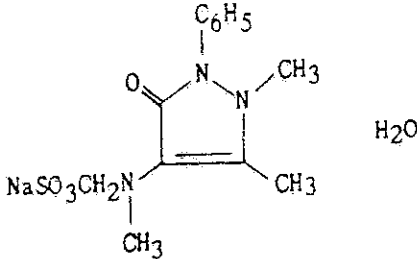
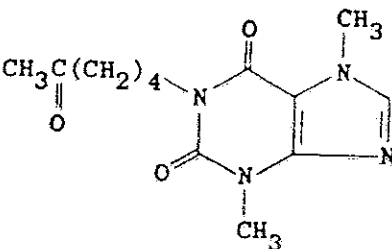
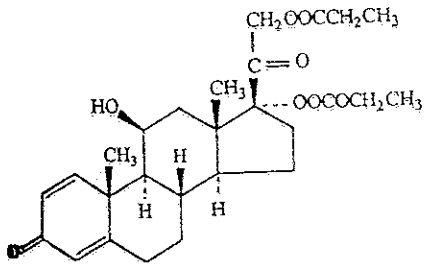
Nombre común	Fórmula molecular
Ciclopirox olamina	
Clobenzorex clorhidrato	
Clobazam	
Furosemida	
Glibenclamida	

TABLA II: ESTRUCTURAS MOLECULARES (Continuación).

Nombre común	Fórmula molecular
Loprazolam metasulfonato	
Metamizol sódico (Dipirona)	
Pentoxifilina	
Prednicarbato	

(Merck Index, 1989)

ANEXO 2

La validación de un proceso significa el establecimiento de evidencia documentada que provea un alto grado de confianza en cuanto que un proceso produzca consistentemente un producto, cumpliendo con las especificaciones predeterminadas y las características de calidad (Traducción libre de FDA Guideline, 1997).

Diagrama # 3: Esquematación del proceso de validación (Infodinamics, 1997).

(PMV: plan maestro de validación)

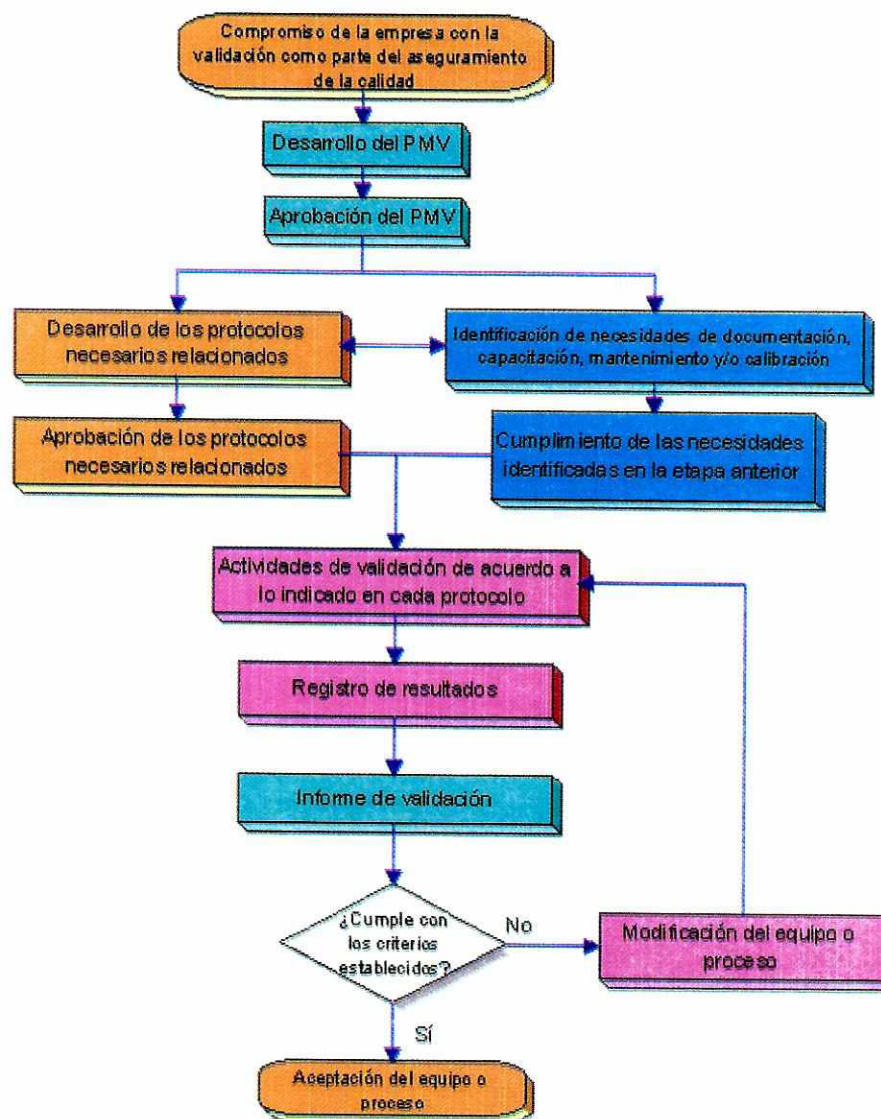


Diagrama # 4: Interrelación entre varios pasos a lo largo de una validación de procesos (Infodynamics, 1997).

