

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

TRABAJO DE TESIS DE GRADO

Para optar el grado de

LICENCIADO EN QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DIRECTA DE AMOXICILINA EN FORMULACIONES FARMACÉUTICAS
UTILIZANDO ABSORCIOMETRÍA MOLECULAR UV Y HERRAMIENTAS DE CALIBRACIÓN
MULTIVARIADA**

Presentado por

GABRIEL BARRERA

Director

Dr. JOSÉ MANUEL CAMIÑA

Co-director

Lic. MIGUEL ÁNGEL CANTARELLI

SANTA ROSA (LA PAMPA). ARGENTINA

2010

PREFACIO

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Química de La Universidad Nacional de la Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y naturales, bajo la Dirección del Dr. José Manuel CAMIÑA y la codirección del Lic. Miguel Ángel CANTARELLI.

Gabriel Ernesto BARRERA

01 de Julio de 2010

Departamento de Química

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad Nacional de La Pampa

RESUMEN

La cuantificación de amoxicilina, según la farmacopea argentina, debe realizarse utilizando métodos volumétricos, los cuales presentan características de poseer elevados valores de desviación estándar debido a los errores operacionales en juego para análisis replicados. Situación similar es dada para la determinación del antibiótico empleando análisis bacteriológicos, que presentan importantes niveles de error debido al uso de matrices biológicas. Otras metodologías existentes, incluyen la utilización de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), espectroscopía infrarrojo de reflectancia difusa con transformación de Fourier (DRIFT), análisis de inyección secuencial (SIA) y electroforesis capilar de zona (CZE), métodos que presentan elevada exactitud y precisión, pero con un muy elevado costo de adquisición. En virtud de lo expuesto, el presente trabajo tiene por objeto la cuantificación de amoxicilina en formulaciones farmacéuticas comerciales, empleando como herramienta de análisis instrumental, la absorciometría molecular UV y empleando cuadrados mínimos parciales (PLS) como herramientas de tratamiento de datos multivariados. A partir del presente trabajo se prevé el desarrollo de una nueva metodología de análisis de bajo costo instrumental, pero con adecuadas propiedades analíticas, que permitan su empleo en la industria farmacéutica, como así también en laboratorios de control de calidad de medicamentos

SUMMARY

The quantification of amoxicillin, according to the pharmacopoeia of Argentina, should be carried out using volumetric methods, which have characteristics of high values of standard deviation due to operational errors for replicate analysis. A similar situation is given for the determination of antibiotics by means of bacteriological analysis, which have significant levels of error due to use of biological matrices. Other methodologies, including the use of high performance liquid chromatography (HPLC), diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFT), sequential injection analysis (SIA) and capillary zone electrophoresis (CZE), they have high accuracy and precision, but also very high cost of instrumental acquisition. For these reasons, the present work aims at the quantification of amoxicillin in commercial pharmaceutical formulations, using molecular UV spectroscopy as instrumental analysis and partial least squares (PLS) as processing tools for multivariate data. From this work it hopes for the development of a new methodology for analysis of low-cost instruments, but with good analytical properties, allowing its use in the pharmaceutical industry, as well as laboratory quality control of medicines.

INDICE

CAPITULO 1. OBJETIVOS DEL TRABAJO PROPUESTO.....	1
CAPITULO 2. INTRODUCCIÓN	
2.1. RESEÑA HISTÓRICA DE LOS ANTIBIÓTICOS.....	3
2.2. ANTIBIÓTICOS.....	4
2.2.1. Antibiosis.....	4
2.2.2. Homeostasis.....	4
2.2.3. La acción de Antibióticos.....	5
2.2.4. Administración de Antibióticos.....	5
2.2.5. Fabricación.....	6
2.2.5.1. Naturales.....	6
2.2.5.2. Sintéticos.....	6
2.2.6. Espectro Bacteriano.....	7
2.2.7. Variedades.....	7
2.2.7.1. Penicilinas.....	7
2.2.7.2. Cefalosporinas.....	7
2.2.7.3. Aminoglicósidos.....	7
2.2.7.4. Tetraciclinas.....	8
2.2.7.5. Macrólidas.....	8
2.2.7.6. Polipéptidos.....	8
2.2.7.7. Sulfo drogas.....	8
2.2.7.8. Otros antimicrobiales.....	8

2.2.7.8.1. Antifungales.....	8
2.2.7.8.2. Antivirales.....	8
2.2.8. La resistencia y los efectos.....	9
2.3. ELEGIR LA DROGA APROPIADA.....	9
2.4. ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS.....	10
2.4.1. Clasificación y estructura química.....	10
2.4.2. Farmacocinética y farmacodinámica.....	14
2.4.3. Mecanismos de acción.....	16
2.4.4. Espectro antibacteriano.....	17
2.4.5. Mecanismos de resistencia.....	18
2.4.6. Prevalencia local de la resistencia.....	19
2.5. AMOXICILINA.....	19
2.6. METODOLOGÍA DE CALIBRACIÓN MULTIVARIADA.....	21
2.6.1. Introducción.....	21
2.6.2. Clasificación de los Métodos Multivariados.....	27
2.6.2.1. Clasificación Lineales – No lineales.....	27
2.6.2.2. Clasificación Selección – Espectro completo.....	28
2.6.2.3. Clasificación Directos – Indirectos.....	28
2.6.2.4. Clasificación Inversos – Clásicos.....	29
2.6.2.5. Clasificación Rígidos – Flexibles.....	30
2.6.3 Diferenciación entre Metodologías PLS y PCR.....	30
2.6.4. Fundamentos Matemáticos del PLS.....	32

2.6.5. Tratamiento de Datos Analíticos por PLS.....	38
2.6.5.1. Calibración o confección de un Modelo PLS.....	38
2.6.5.1.1. Raíz Cuadrada del Error Medio de la Calibración y Porcentaje de Varianza Explicada	39
2.6.5.1.2. Raíz Cuadrada del Error Medio de Predicción.....	40
2.6.5.1.3. Otros Parámetros de Evaluación del Modelo.....	42
2.6.5.2. Validación del Modelo.....	43
2.6.5.3. Predicción.....	43
2.6.6. Paquetes Estadísticos para el Empleo de la Metodología PLS.....	44

CAPITULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. REACTIVOS.	46
3.1.1. Soluciones Estándar.....	46
3.1.1.1. Solución de Amoxicilina.....	46
3.1.1.2. Solución de diclofenac.....	46
3.1.1.3. Solución Reguladora pH.....	46
3.1.1.4. Agua Deionizada.....	46
3.1.2. Preparación de muestras farmacéuticas comerciales.....	46
3.2. INSTRUMENTAL.....	47
3.2.1. Medidas Absorciométricas.....	47
3.2.2. Medidas y Ajuste de pH.....	47

CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Modelo de Calibración obtenido a través de Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS).....	48
4.2. Evaluación del Modelo PLS.....	49
4.2.1. Calibración.....	49
4.2.2. Validación del modelo PLS.....	51
4.2.2.1. Muestras de validación.....	51
4.3. Evaluación de amoxicilina en el Modelo de Calibración.....	52
4.4. Cuantificación de amoxicilina en muestras farmacéuticas comerciales....	53

CAPITULO 5. CONCLUSIONES

5.1. Del Pretratamiento de Muestra.....	54
5.2. De los Costos Instrumentales.....	54
5.3. De las Ventajas Multivariadas.....	54
5.4. De la Aplicabilidad del Método.....	55

CAPITULO 6. BIBLIOGRAFÍA.....	56
--------------------------------------	-----------

CAPÍTULO 1

OBJETIVOS DEL TRABAJO PROPUESTO

El uso de herramientas de calibración multivariada, ha ido en creciente aumento, debido a la necesidad de procesar una gran cantidad de datos obtenidos por el instrumental analítico actual y favorecido por el desarrollo de los nuevos sistemas informáticos de gran capacidad de procesamiento (tanto sea programas como equipos y sistemas de computación) generando un conjunto de análisis de datos sumamente valioso para el desarrollo de la Química. Estos sistemas de análisis de datos, han adquirido incluso la categoría de subdisciplina, la cual es conocida en su conjunto con el nombre de Quimiometría. El uso de herramientas de análisis computacionales también se ha aplicado con éxito en otras disciplinas como la Economía, Psicología, Ciencias Sociales, Biología, etc.

La ventaja multivariada radica en la posibilidad de analizar muestras complejas, utilizando herramientas analíticas rápidas y económicas, a través de los sistemas multivariados de análisis. El análisis convencional de muestras complejas implica el uso de procesos separativos engorrosos para la eliminación de interferencias, como así también la utilización de instrumental analítico de elevado costo, el cual no siempre es asequible en laboratorios de docencia y de control de calidad de bajo presupuesto.

Un tipo de muestra compleja para analizar resultan los antibióticos en formulaciones comerciales. Éstos están normalmente constituidos por combinaciones de diferentes principios activos: ampicilina, amoxicilina, diclofenac, ácido clavulánico, gentamicina, amikacina, fluoroquinolonas o aminoglicósidos. Además se debe incluir la presencia de diferentes excipientes que producen importantes efectos de matriz. La determinación analítica convencional de estas especies involucra el uso de técnicas instrumentales de muy elevado costo, como por ejemplo la electroforesis capilar, espectroscopía infrarrojo de reflectancia difusa con transformación de Fourier, la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa y la cromatografía de intercambio iónico de alta resolución. [1-3]. Si bien estas técnicas instrumentales son referenciales, el elevado costo de equipamiento hace poco factible su adquisición para laboratorios de docencia y de análisis de rutina para control de calidad. Es en este aspecto donde el uso de herramientas

multivariadas adquiere connotaciones de importancia y de factibilidad para laboratorios con recursos limitados.

El objetivo del presente trabajo es desarrollar el modelado de un sistema multivariado para la cuantificación de amoxicilina presente en formulaciones farmacéuticas comerciales accesibles en el mercado, empleando absorciometría molecular UV como metodología instrumental y tratamiento de datos espectrales a través de calibración multivariada en su variante PLS1 (Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales).

CAPÍTULO 2

INTRODUCCIÓN

2.1. RESEÑA HISTÓRICA DE LOS ANTIBIÓTICOS

Con el descubrimiento de la penicilina realizado por Alexander Fleming en el año 1928 y su adopción a la terapéutica, los antibióticos comienzan a desempeñar un papel importante en la historia de la humanidad. En laboratorios de todo el mundo civilizado una multitud de investigadores se dedicaron a buscar nuevos antibióticos; surgía una nueva esperanza en la lucha del hombre contra las enfermedades y el dolor.

Se define a los antibióticos como aquellas sustancias producidas por microorganismos, que tienen acción bacteriostática o bactericida, fungistática o fungicida; en su mayoría han resultado también tóxicas para formas de vidas superiores. Son pocos los antibióticos que resultan plenamente efectivas para proteger al hombre y animales contra microorganismos patógenos, así como los que tienen acción sobre un gran número de bacterias, siendo muy escasos los efectivos contra hongos. Las bacterias gram positivas parecen, por lo general, ser más sensibles a su acción que las gram negativas. [4]

Se han obtenido antibióticos de diversos microorganismos, a saber: bacterias no esporuladas, bacterias aerobias esporuladas, actinomicetes y estreptomicetes, hongos filamentosos, basidiomicetes y algas. [5]

El término antibiótico fue propuesto por Selman A. Waksman, descubridor de la estreptomicina en el año 1943, para definir sustancias dotadas de actividad antimicrobiana y extraídas de estructuras orgánicas vivientes. Sin embargo, ya en el año 1889 Jean Paul Vuillemin, en un trabajo titulado "Symbiose et antibiose" [6], crea el término antibiosis para describir la lucha entre seres vivos para la supervivencia. Más tarde, Ward adopta esta palabra para describir el antagonismo microbiano. Con posterioridad, ya en plena era antibiótica, el término significó, durante algún tiempo, sustancia extraída de seres vivos, ya fueren bacterias, hongos, algas, con capacidad para anular la vida de diversos microorganismos.

El antibiótico viene de un mundo vivo. Pero el avance de la técnica, el conocimiento progresivo de las fórmulas de diversos antibióticos y la posibilidad de su preparación sintética partiendo de bases químicas, desdibujaron valor del origen de los mismos.

2.2. ANTIBIOTICOS

Son sustancias medicinales seguras que tienen el poder para destruir o detener el crecimiento de organismos infecciosos en el cuerpo. Los organismos pueden ser bacterias, virus, hongos, o animales minúsculos llamados protozoos. Un grupo particular de estos agentes constituyen las drogas llamadas antibióticos, del Griego anti ("contra") y bios ("vida"). Algunos antibióticos son producidos por organismos vivientes tales como bacterias, hongos, y esporas. Otros son en parte o totalmente sintéticos, es decir, producidos artificialmente. La penicilina es quizás el mejor antibiótico conocido. Su descubrimiento y su posterior desarrollo han permitido a la profesión médica tratar efectivamente muchas enfermedades infecciosas, incluyendo algunas que alguna vez amenazaron la vida. [7]

2.2.1. ANTIBIOSIS

La relación general entre un antibiótico y un organismo infeccioso es de antibiosis. Esta palabra refiere a una asociación de dos organismos en la que uno es dañado o es matado por el otro. La relación entre seres humanos y la enfermedad que ocasionan los gérmenes es de antibiosis. Si una persona es afectada por gérmenes, ésta es el organismo lastimado; si el ataque de germen es repelido por las defensas del cuerpo, los gérmenes son los organismos lastimados. Cuando el sistema de defensa de una persona no puede controlar la antibiosis a su propio favor, se usan los antibióticos para desequilibrar la balanza hacia la salud humana. [4]

2.2.2. HOMEOSTASIS

El balance del cuerpo entre la salud y la enfermedad se llama homeostasis. Esto en su mayor parte depende de la relación del cuerpo con las bacterias con las que convive. Por ejemplo, las bacterias que siempre están presentes sobre la piel humana. Cuando la piel es cortada, las bacterias son capaces de penetrar dentro del cuerpo y pueden ocasionar una infección. Comúnmente las bacterias invasoras son destruidas por células específicas presentes en la sangre llamadas fagocitos (phagocytes) y por diversas acciones del sistema inmunológico. Cuando hay demasiadas bacterias como para ser manejadas por el sistema, o la persona infectada tiene una baja resistencia a la infección, se produce la enfermedad y son necesarios los antibióticos para ayudar a restaurar la homeostasis [4]

2.2.3. LA ACCIÓN DE ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos pueden ser bacteriostáticos (bloquean el crecimiento y multiplicación celular) o bactericidas (producen la muerte de las bacterias). Para desempeñar estas funciones, los antibióticos deben ponerse en contacto con las bacterias.

Se cree que los antibióticos se vinculan a la superficie de las membranas celulares de bacterias, ocasionando un cambio en su capacidad de reproducirse. La prueba de la acción de un antibiótico en el laboratorio muestra cuanta exposición a la droga es necesaria para frenar la reproducción o para matar las bacterias. Aunque a una gran cantidad de un antibiótico le tomaría un tiempo menor para matar las bacterias que ocasionan una enfermedad, tal dosis comúnmente haría que la persona sufra de una enfermedad ocasionada por la droga. Por lo tanto, los antibióticos se dan en una serie de cantidades pequeñas. Esto asegura que las bacterias son eliminadas o reducidas a un número suficiente como para que el cuerpo las pueda repeler. Cuando se toma una cantidad insuficiente de antibiótico, las bacterias pueden frecuentemente desarrollar métodos para protegerse a sí mismas contra este antibiótico. Por lo cual la próxima vez que se utilice el antibiótico contra estas bacterias, no será efectivo. [8]

2.2.4. ADMINISTRACIÓN DE ANTIBIÓTICOS

Para actuar contra organismos infecciosos, un antibiótico puede aplicarse externamente, como en el caso de una cortadura sobre la superficie de la piel, o internamente, alcanzando la corriente sanguínea dentro del cuerpo. Los antibióticos se producen de varias formas y en diferentes maneras.

Las formas de administrar antibióticos son:

- **Local.** La aplicación local significa "a un área local" tal como sobre la piel, en los ojos, o sobre la membrana mucosa. Los antibióticos para el uso local están disponibles en forma de polvos, ungüentos, o cremas.
- **Oral.** Hay dos formas de acción para la aplicación por vía oral. Las tabletas, líquidos y cápsulas que se tragan. En este caso el antibiótico se libera en el intestino delgado para ser absorbido en la corriente sanguínea. Caramelos o pastillas, que se disuelvan en la boca, donde el antibiótico se absorbe a través de la membrana mucosa.

- **Parenteral.** Las aplicaciones fuera del intestino se llaman parenterales. Una forma de aplicación es mediante una inyección, que puede ser subcutánea (debajo la piel), intramuscular (en un músculo), o intravenosa (en una vena). La administración parenteral de un antibiótico se usa cuando un médico requiere una concentración fuerte y rápida del antibiótico en la corriente sanguínea. [5]

2.2.5. FABRICACIÓN

2.2.5.1. NATURALES

Hasta hace un tiempo todos los antibióticos se producían a partir de organismos vivos. Este proceso, conocido como biosíntesis, se usa todavía en la fabricación de algunos antibióticos. Realmente los organismos son los que fabrican el antibiótico. Los laboratorios productores proveen las condiciones favorables para que los organismos puedan hacer su trabajo y luego poder extraer la droga.

Actualmente la mayoría de los antibióticos naturales son producidos por fermentación por etapas. En este método se hacen crecer cepas de microorganismos de alto rendimiento bajo condiciones óptimas y en un medio nutritivo, dentro de tanques de fermentación de varios miles de litros de capacidad. Esto forma un caldo que se mantiene a una temperatura de 25 °C y es agitado por más de 100 horas. A continuación las cepas son retiradas del caldo de fermentación y luego se extrae el antibiótico del caldo mediante filtración, precipitación o algún otro método de separación [9]

2.2.5.2. SINTÉTICOS

Todos los tipos de penicilina poseen un núcleo químico idéntico llamado anillo. La cadena química que está adjunta al anillo es diferente en cada tipo. Cambiando las moléculas de la cadena, los científicos diseñan drogas con efectos potencialmente diferentes sobre organismos diferentes. Algunas de estas drogas son útiles para tratar infecciones, algunas no lo son. Los fabricantes farmacéuticos ahora utilizan imágenes generadas por computadora de los anillos y experimentan con una variedad interminable de cadenas posibles. Los investigadores han desarrollado antibióticos con vida media larga (el período de eficacia) que permite tomar la medicación una vez en 24 horas en vez de cada pocas horas. Los antibióticos más nuevos son también más efectivos contra una gama más amplia de infecciones de lo que eran las drogas anteriores. [9]

2.2.6. ESPECTRO BACTERIANO.

La acción de un antibiótico se mide en términos de espectro bacteriano. Se observa que algunos antibióticos como la penicilina actúan en un sector restringido: cocos gram negativos y gram positivos, espiroquetas y bacterias gram positivas. Por esta razón se la denomina de espectro limitado. Otros antibióticos como las tetraciclinas y el cloranfenicol, lo hacen en múltiples organismos y por eso se les adjudica el nombre de amplio espectro. Otros antibióticos actúan sobre una fracción muy limitada, por ejemplo, nistanina sobre la *Candida albicans*. A este tipo de antibiótico se lo llama de espectro selectivo. [10]

2.2.7. VARIEDADES

Hay docenas de antibióticos. Los siguientes son de uso común:

2.2.7.1. PENICILINAS

Los diversos tipos de penicilinas constituyen un gran grupo de antibióticos antibacteriales de los cuales los derivados de la benzil penicilina son los únicos de que se producen naturalmente a partir de cepas. La Penicilina G y la ampicilina están en esta clase. Otra penicilina, llamada piperacilina, ha mostrado ser efectiva contra un 92 por ciento de las infecciones sin ocasionar efectos colaterales serios. Las penicilinas se administran frecuentemente en combinación con otras drogas. [11]

2.2.7.2. CEFALOSPORINAS

Parecidas a las penicilinas, las cefalosporinas se utilizan frecuentemente cuando una sensibilidad (reacción alérgica) a las penicilinas se conoce o es sospechada en un paciente. Ceftriaxona sódica es un tipo de cefalosporina que es muy efectiva para combatir infecciones profundas tales como las que ocurren en los huesos y como resultado de una cirugía.

2.2.7.3. AMINOGLICÓSIDOS

Los aminoglicósidos incluyen la estreptomycin y la neomicina. Estas drogas se usan para tratar tuberculosis, la peste bubónica, y otras infecciones. A causa de los efectos colaterales potencialmente serios que genera, tal como interferencia a la audición y sensibilidad a la luz del sol, estas drogas se administran con cuidado. (Todos los antibióticos se administran con cuidado; el cuidado especial se toma por las posibles consecuencias negativas superiores a las usuales de administración de una droga.)

2.2.7.4. TETRACICLINAS.

Las tetraciclinas son efectivas contra la neumonía, el tifo, y otras bacterias que ocasionan la enfermedad pero puede dañar la función del hígado y riñones. La tetraciclina en un gel base especial se usa para tratar muchas infecciones oculares.

2.2.7.5. MACRÓLIDAS

Las macrólidas se usan frecuentemente en pacientes que resultan ser sensibles a la penicilina. La eritromicina es la mejor medicina conocida en este grupo.

2.2.7.6. POLIPÉPTIDOS

La clase de antibióticos llamados polipéptidos es bastante tóxica (venenosa) y se usa mayormente sobre el superficie de la piel (tópicamente). La bacitracina se encuentra en esta categoría.

2.2.7.7. SULFODROGAS

La sulfonamida fue la primer droga antimicrobial sintética que fue usada. Las sulfodrogas, que se hicieron a partir de químicos, tienen en su mayor parte los mismos efectos que las penicilinas derivadas posteriormente desarrolladas. Aunque las sulfodrogas pueden tener efectos nocivos sobre los riñones, son efectivas contra infecciones de riñón por ello se toman siempre con grandes cantidades de agua para impedir la formación de cristales de la droga. Gantrisin es todavía la más útil entre estas sulfadrogas. [12]

2.2.7.8. OTROS ANTIMICROBIALES

Otros antimicrobiales incluyen furazolidone y tritethoprim. El primero se usa primariamente en infecciones gastrointestinales; el posterior, cuando se combina con una de las sulfonamidas, es efectivo en infecciones urinarias y respiratorias

2.2.7.8.1. Antifungales. Los antifungales combaten la enfermedad ocasionada por hongos tal como cándida. El hongo que ocasiona la infección requiere tratamiento a largo plazo. Las drogas tales como griseofulvin se toman frecuentemente por seis meses. La mayoría de la infección fungales ocurren sobre la piel o la membrana mucosa.

2.2.7.8.2. Antivirales. Muy pocas se conocen para tratar infecciones virósicas (el resfrío común es un ejemplo). Un virus es el agente infeccioso más pequeño con la capacidad para duplicarse (reproducirse) a sí mismo. Además, posee capacidades de mutación, o cambio, con gran rapidez. Otras drogas microbicidas tienen poco efecto sobre

un virus y se dan únicamente para tratar infecciones bacteriológicas que acompañan o resultan desde la infección virósica primaria. [8]

2.2.8. LA RESISTENCIA Y LOS EFECTOS

Un antibiótico actúa limitando o deteniendo el crecimiento de un microorganismo específico. Probablemente realiza esto al interferir con la pared de la célula de bacterias que es la estructura blanco u objetivo, mientras a la vez tiene poco efecto sobre las células normales del cuerpo.

Cuando un ser humano se expone continuamente al antibiótico por una enfermedad de larga duración (tal como fiebre reumática), las bacterias expuestas al antibiótico pueden desarrollar su defensa propia contra la droga. Una enzima que puede destruir la droga puede ser producida por las bacterias o, por otros mecanismos, la célula puede llegar a ser resistente a la acción del antibiótico.

Las reacciones alérgicas a los antibióticos se han visto comúnmente como manchas sobre la piel, anemia severa (demasiado pocas células rojas de sangre), desorden estomacal, y ocasionalmente puede producir sordera. Alguna vez se pensó que las reacciones alérgicas a los antibióticos, de penicilina en particular, eran frecuentes y permanentes. Sin embargo estudios recientes sugieren que mucha gente acrecienta su sensibilidad, incluso aunque nunca fueron alérgicas. El número grande de antibióticos ahora disponibles permiten una elección de tratamiento que puede, en la mayoría de los casos, evitar la alergia ocasionada por las drogas.

Vale la pena recordar que todas las drogas pueden ocasionar efectos deseables e indeseables sobre el cuerpo. Los indeseables se llaman contraindicaciones, y estos deben equilibrarse con los efectos deseados para definir si una droga particular produce mas daño que bienestar. Es un hecho que todas las drogas tienen el potencial de ser beneficiosas o nocivas para la salud humana.

2.3. ELEGIR LA DROGA APROPIADA

Los médicos pueden determinar generalmente el tipo de organismo responsable de ocasionar las infecciones más frecuentes y saber que la clase de antibiótico será el más efectivo para combatirlo. Pero a veces el agente que ocasiona la enfermedad no es conocido; en este caso, un cultivo obtenido de la infección se examina bajo un microscopio

para identificar el organismo invasor. Los resultados del trabajo de laboratorio permiten que el médico prescriba el antibiótico más efectivo contra la enfermedad específica. [5]

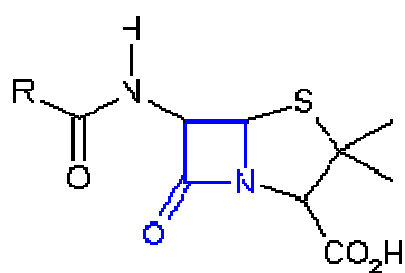
2.4. ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS

Los betalactámicos, que actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Se trata de compuestos de acción bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática, que presentan escasa toxicidad y poseen un amplio margen terapéutico. Su espectro se ha ido ampliando a lo largo de los años por la incorporación de nuevas moléculas con mayor actividad frente a los bacilos gram negativos; pero la progresiva aparición de resistencias adquiridas ha limitado su uso empírico y su eficacia en determinadas situaciones. Aun así, la penicilina sigue siendo el tratamiento de elección en un buen número de infecciones clásicas. [13]

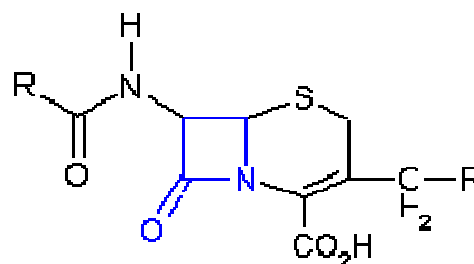
Tras 70 años de uso clínico, que se iniciaron con la administración de penicilina a un paciente con sepsis estafilocócica en 1941, los betalactámicos son los antimicrobianos más prescritos, tanto en atención primaria como en los hospitales. A pesar de que no se dispone de ningún betalactámico realmente nuevo desde hace más de dos décadas, el aumento incesante de las resistencias y los avances en el conocimiento de sus mecanismos moleculares han condicionado que exista una gran cantidad de información en la literatura sobre cada uno de los componentes de esta familia de antibióticos. [14]

2.4.1. CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA QUÍMICA

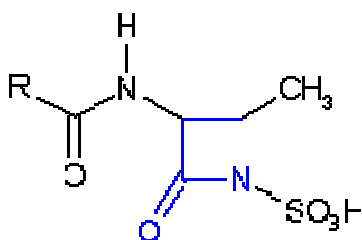
La presencia de un anillo betalactámico define químicamente a esta familia de antibióticos, de la que se han originado diversos grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, monobactamas e inhibidores de las betalactamasas, tal como se observa en la figura 2.1.



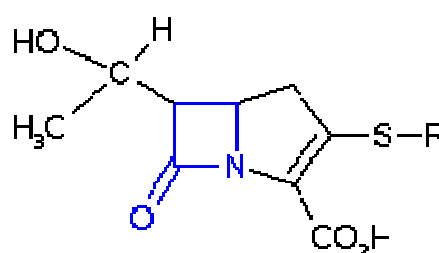
Núcleo de Penicilinas



Núcleo de Cefalosporinas



Núcleo de Monobactamas

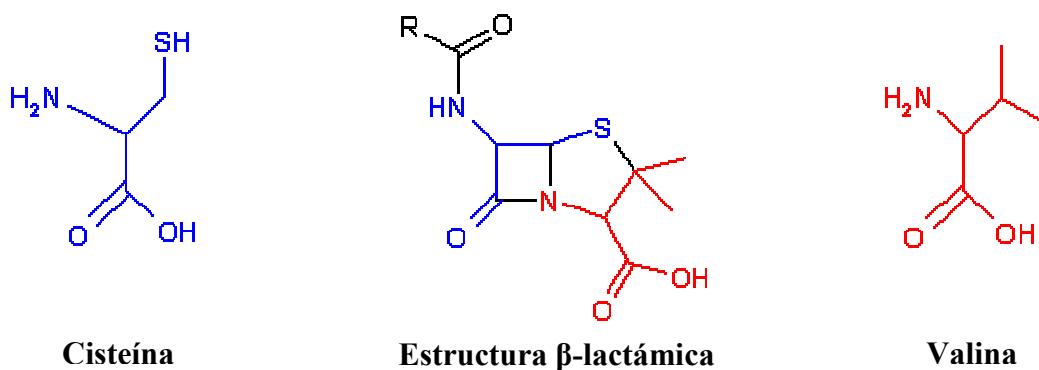


Núcleo de Carbapenemas

Figura 2.1. Estructuras de antibióticos betalactámicos.

Todos estos comparten un anillo β -lactámicos común, que se muestra en azul. El anillo es muy tenso y el vínculo entre el carbonilo y el nitrógeno en el anillo β -lactámico es muy lábil y por lo tanto hace la molécula reactiva. [15]

La estructura del anillo β -lactámico se deriva del enlace covalentes de dos residuos de aminoácidos; cisteína y valina. Esta se forma a través de un tripéptido intermedio donde el tercer aminoácido se sustituye por el grupo variable R, tal como se muestra en la figura 2.2.



Cisteína

Estructura β -lactámica

Valina

Figura 2.2. Formación del anillo betalactámico.

Las penicilinas son un grupo de antibióticos que contienen un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico, estructura que deriva de la condensación de una molécula de valina y una de cisteína para dar lugar al doble anillo característico. Además tienen una cadena lateral, que varía de unas penicilinas a otras en la posición 6 del anillo betalactámico y que es la que define sus propiedades (Figura 2.3).

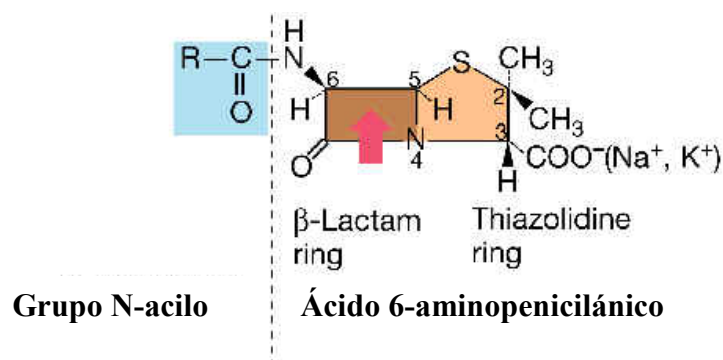


Figura 2.3. Estructura general de las penicilinas. Se observa que el núcleo de 6-APA consta del anillo betalactámico y del anillo tiazolidínico. En celeste se muestra el radical acilo, que se puede modificar para generar distintas penicilinas semisintéticas con propiedades diferentes a la penicilina natural

Las cefalosporinas (figura 2.4) son fármacos estructuralmente similares a las penicilinas, cuya estructura básica está constituida por el núcleo cefem, que consiste en la fusión de un anillo dihidrotiacínico (en lugar del anillo tiazolidínico característico de las penicilinas) y un anillo betalactámico. La introducción de modificaciones en las cadenas laterales origina las diversas cefalosporinas.

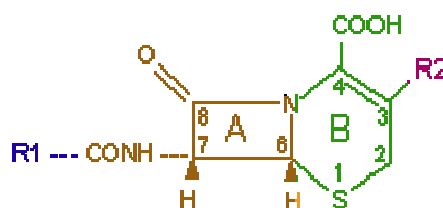


Figura 2.4. Estructura básica de las cefalosporinas

En la actualidad únicamente se emplean en clínica médica, inhibidores de las betalactamasas de estructura química betalactámica. El ácido clavulánico tiene un núcleo similar al ácido penicilánico de las penicilinas con la sustitución del átomo de azufre en posición 3 por un átomo de oxígeno (que incrementa la reactividad de la molécula y

proporciona una afinidad mayor por las betalactamasas), y la falta de la cadena lateral acilamino en posición 6. (Figura 2.5).

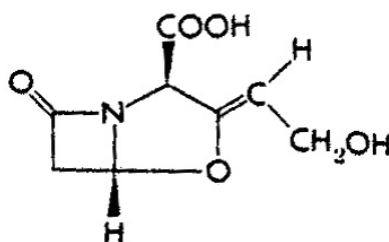


Figura 2.5. Estructura molecular del ácido clavulánico

El sulbactam es una sulfona semisintética del ácido penicilánico (figura 2.6). El tazobactam se diferencia del sulbactam por la presencia de un grupo tiazol en posición 3. [16]

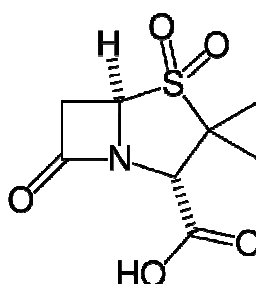


Figura 2.6. Estructura molecular del sulbactam

La estructura básica de las carbapenemas consiste en un anillo betalactámico fusionado a uno pirrolidínico compartiendo un nitrógeno, tal como se observa en la figura 2.7. Estas modificaciones y las cadenas laterales, así como la posición espacial de éstas, condiciona la mayor afinidad por las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) diana, un incremento de la potencia, del espectro antibacteriano y de la resistencia a las betalactamasas, siendo los betalactámicos de más amplio espectro y actividad. [17]

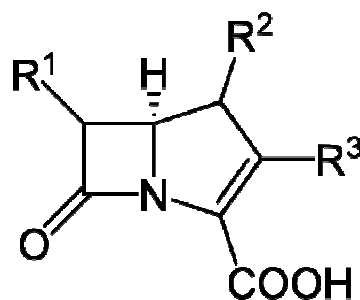


Figura 2.7. Estructura molecular de carbapenemas

Los monobactámicos son derivados del ácido 3-aminomonobactámico (3-AMA). Tienen una estructura betalactámica sencilla con una estructura monocíclica en la que el anillo betalactámico no está fusionado a otro secundario, como el caso del aztreonam (figura 2.8).

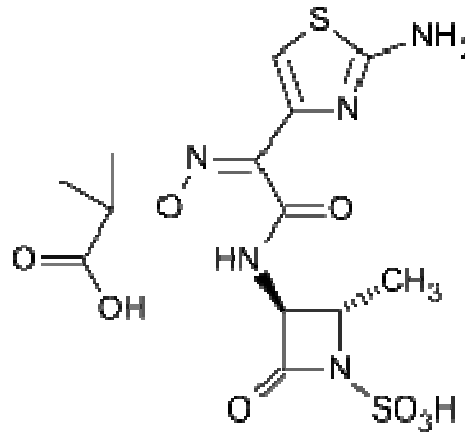


Figura 2.8. Estructura molecular del aztreonam. El anillo cuadrado es el beta-lactam y el segundo anillo es el tiazol, el cual no está ligado directamente al betalactam.

2.4.2. FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINÁMICA

Mediante la administración intravenosa suelen alcanzarse con rapidez concentraciones plasmáticas elevadas. Las penicilinas procaína y benzatina se depositan a nivel muscular y se reabsorben lentamente; la administración intramuscular de ceftriaxona consigue concentraciones plasmáticas elevadas, con niveles terapéuticos durante 24 h.

Los antibióticos de origen biológico se absorben poco o nada por vía digestiva, mientras que la absorción de algunos derivados sintéticos y semisintéticos es mejor (amoxicilina, cloxacilina, cefalosporinas orales). En la sangre circulan como sustancias libres o unidas a las proteínas plasmáticas, relacionándose esta unión con la vida media del antibiótico; sólo la fracción libre es activa y capaz de penetrar al espacio extracelular.

Los antibióticos poseen una amplia distribución corporal, con valores séricos y tisulares adecuados, incluyendo bilis y líquido sinovial; cuando existe inflamación del líquido cefalorraquídeo (LCR), la penetración a través de la barrera hematoencefálica aumenta hasta el 10-30%, siendo especialmente elevada para la cloxacilina y las cefalosporinas de tercera y cuarta generación. Al tratarse de sustancias poco lipofílicas, su penetración intracelular es escasa, no alcanzando casi nunca concentraciones mayores del 25-50% del total administrado en las soluciones plasmáticas. [18]

El metabolismo de la mayoría de betalactámicos es casi nulo, manteniéndose en forma activa hasta su eliminación renal. En algunos preparados predomina la excreción por vía biliar (cefoperazona, ceftriaxona). Muy pocos sufren metabolismo, como la desacetilación (cefalotina, cefotaxima) o la inactivación por las hidroxipeptidasas renales (imipenem). [11]

Los betalactámicos son antibióticos de actividad bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática alcanzada, siempre que ésta exceda la concentración inhibitoria mínima (CIM) del agente causal. La actividad bactericida y probablemente la eficacia clínica se relacionan mejor con el tiempo durante el cual dicha concentración excede la CIM ($T > CIM$). Para la mayoría de las infecciones se considera adecuado que el tiempo que supera la CIM sea como mínimo el 40% del intervalo entre dosis; pero en pacientes neutropénicos o con meningitis es probable que sea mejor estar todo el tiempo por encima de la CIM. El efecto postantibiótico (EPA) consiste en la acción residual del antibiótico sobre la bacteria después de descender las concentraciones terapéuticas en la sangre y los tejidos por debajo de la CIM. En el caso de los antibióticos betalactámicos, el EPA es de corta duración, con la excepción de los carbapenémicos, que presentan un EPA apreciable tanto sobre grampositivos como sobre gramnegativos. Estos parámetros indican que alargar los intervalos entre dosis puede llevar a fracasos terapéuticos. Obviamente estas consideraciones no son válidas en el caso de betalactámicos con una vida media muy prolongada, que se administran cada 24 h, como la ceftriaxona (parenteral) o la cefixima (oral). La actividad bactericida de los betalactámicos disminuye cuanto mayor es el tamaño del inóculo bacteriano; este hecho es especialmente relevante en el tratamiento de los abscesos, donde además las poblaciones bacterianas pueden hallarse en fase estacionaria. En infecciones con un gran inóculo, como la neumonía nosocomial causada por bacilos gram negativos (BGN) es también más fácil seleccionar mutantes resistentes, por lo que puede no ser adecuado el empleo de los betalactámicos en monoterapia. La combinación de penicilinas y aminoglucósidos es sinérgica frente a estreptococos y enterococos y la de penicilinas y cefalosporinas lo es también frente a ciertos BGN, sobre todo *Pseudomonas aeruginosa*. Este hecho tiene especial relevancia en el tratamiento de la endocarditis bacteriana, de las infecciones por pseudomonas y de las infecciones en pacientes neutropénicos. [7]

2.4.3. MECANISMO DE ACCIÓN

Los antibióticos betalactámicos son agentes bactericidas que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana e inducen además un efecto autolítico. La destrucción de la pared celular bacteriana se produce como consecuencia de la inhibición de la última etapa de la síntesis del peptidoglicano. En las bacterias gram positivas, la pared celular es gruesa y su componente principal es dicha proteína. Las bacterias gram negativas tienen una pared más fina y compleja que consta de una membrana externa formada por lípidos y proteínas y de una delgada capa interna de peptidoglucano. Las bacterias ácido-alcohol resistentes tienen una pared similar a la de los microorganismos gram positivos, pero con una capa de peptidoglucano fina y, por fuera, una capa muy rica en lípidos. [13]

El peptidoglucano está constituido por largas cadenas de glúcidos (-glucano), formadas por la repetición de moléculas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. El ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos (péptido-) que se unen entre sí para formar una malla, en forma directa (gram negativos) o mediante un pentapéptido de glicina (grampositivos). Los betalactámicos inhiben precisamente esta unión o transpeptidación, última etapa de la síntesis de la pared celular. De este modo, la pared queda debilitada y puede romperse por la presión osmótica intracelular. Para que actúen los betalactámicos es necesario que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que es período donde se sintetiza la pared celular.

Los componentes del peptidoglucano se sintetizan en el citoplasma y son transportados a través de la membrana citoplasmática al espacio que existe entre ésta y la pared celular. A este nivel existen unas proteínas con actividad enzimática (transpeptidasas y carboxipeptidasas), que son las encargadas de formar los tetrapéptidos unidos. Estas enzimas fijan a las penicilinas y otros betalactámicos, por lo que se llaman PBP. La función de las PBP es alargar, dar forma y dividir la bacteria. Los anillos de los betalactámicos poseen una estructura similar a los dos últimos aminoácidos del pentapéptido (D-alanina-D-alanina) y eso permite una unión covalente en el lugar activo de la transpeptidasa. También pueden inhibir a las carboxipeptidasas y algunas endopeptidasas. [9]

Los betalactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano. La lisis se produce con concentraciones que superan entre 4 y 10 veces la CIM de un determinado microorganismo. Las bacterias que carecen de autolisina son inhibidas pero no destruidas, por lo que se dice que son tolerantes.

Se define el fenómeno de tolerancia como la necesidad de una concentración al menos 32 veces mayor a la CIM para que un antimicrobiano destruya una cepa bacteriana. [13]

2.4.4. ESPECTRO ANTIBACTERIANO

El espectro de los betalactámicos incluye bacterias gram positivas, gram negativas y espiroquetas. No son activos sobre los micoplasmas porque éstos carecen de pared celular, ni sobre bacterias intracelulares como *Chlamydia* y *Rickettsia*. La resistencia natural de las micobacterias se debe a la producción de betalactamasas probablemente unido a una lenta penetración por las características de la pared. [16]

El espectro antimicrobiano de la penicilina G abarca cocos gram positivos y gram negativos y bacilos gram positivos, tanto facultativos como anaerobios, así como espiroquetas y algunos bacilos gram negativos anaerobios. La producción de derivados semisintéticos del ácido 6-aminopenicilánico permitió disponer de preparados activos por vía oral, con mayor resistencia a las betalactamasas y mayor capacidad de penetración en las bacterias gramnegativas, como las aminopenicilinas, las penicilinas antiestafilocócicas y las penicilinas anti-pseudomonas. [17]

Los inhibidores de betalactamasas son moléculas con una elevada afinidad frente a las betalactamasas (mayor que la de los antimicrobianos a los que se asocian) a las que se unen irreversiblemente protegiendo de su acción a los betalactámicos. Todos poseen una baja actividad antibacteriana, con la excepción de sulbactam frente a *Acinetobacter baumannii* y a otros bacilos gram negativos no fermentadores. Su aporte fundamental es debido al hecho de que restauran a los betalactámicos con los que se asocian por su actividad inicial sobre organismos que se han hecho resistentes por producción de betalactamasas (*S. aureus*, *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides spp.*) y amplían el espectro a bacterias que no eran sensibles intrínsecamente por producción natural de estas enzimas (*K. pneumoniae*). [19]

Las cefalosporinas de primera generación son muy activas frente a los cocos gram positivos; en líneas generales, las sucesivas generaciones han perdido parte de esta actividad, en beneficio de una mayor actividad frente a bacilos gram negativos, con notables excepciones. Todas las cefalosporinas son inactivas frente a enterococos, estafilococos resistentes a la meticilina y *Listeria monocytogenes*.

Los carbapenémicos son los betalactámicos de más amplio espectro. Sólo carecen de actividad frente a los estafilococos resistentes a meticilina, enterococos resistentes a vancomicina, algunas especies de *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas maltophilia*, y son poco activos frente a *Clostridium difficile*. Ertapenem es poco activo frente a *P. aeruginosa*.

Aztreonam, el único monobactámico disponible para uso clínico, posee una excelente actividad sobre bacterias gram-negativas aerobias y facultativas. Por el contrario, carece de actividad frente a grampositivos y bacterias anaerobias.

2.4.5. MECANISMOS DE RESISTENCIA

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los betalactámicos por varios mecanismos que en ocasiones se asocian entre sí. El control genético de estos mecanismos puede ser cromosómico, plasmídico o por transposones. La resistencia cromosómica aparece por mutación, mientras que los plásmidos y los transposones pueden ser autotransferibles entre bacterias. [20]

Los mecanismos implicados son los siguientes:

1. Alteraciones de la permeabilidad. La presencia de membrana externa en los bacilos gram negativos dificulta la penetración de sustancias hidrofílicas, como los betalactámicos, que necesitan utilizar los poros proteicos (porinas) para tal fin. La resistencia es secundaria a alteraciones en dichas porinas.

2. Modificación de las dianas. Los betalactámicos deben unirse a las PBP para ejercer su efecto bactericida. Cambios a nivel de las PBP implican una pérdida de afinidad de los betalactámicos por ellas, con la consiguiente disminución de su actividad. Este mecanismo afecta fundamentalmente a cocos grampositivos.

3. Producción de enzimas. Actualmente constituye el principal mecanismo de resistencia a los betalactámicos, sobre todo en las bacterias gram negativas. Las betalactamasas son enzimas catalíticas de naturaleza proteica cuya producción está controlada por un gen, cuyo origen puede ser cromosómico, o bien transferido por plásmidos o transposones. Actúan rompiendo el enlace amídico del anillo betalactámico, previa unión al grupo carboxilo, con lo que éste pierde la capacidad de unirse a las PBP. El grado de resistencia que determinan se correlaciona con su concentración, afinidad por los diferentes betalactámicos y propiedades hidrolíticas.

La producción de betalactamasas puede ser constitutiva (lo cual significa que se producen siempre) o inducible (sólo se produce en presencia de un betalactámico). En este sentido no todos los betalactámicos tienen el mismo poder de inducción, pudiendo ser desde poco a altamente inductores. En los microorganismos gram negativos, las betalactamasas plasmídicas son constitutivas y su grado de producción está en relación con el número de copias del plásmido, mientras que en los estafilococos suelen ser inducibles. Las betalactamasas cromosómicas, que son producidas fundamentalmente por bacterias gramnegativas, pueden ser constitutivas o inducibles.

4. Expresión de bombas de eliminación activa. Los mecanismos de expulsión consisten en bombas de flujo, dependientes de energía, que bombean al antimicrobiano al exterior. Este mecanismo se ha demostrado en ciertos bacilos gram negativos, especialmente en *P. aeruginosa*. [19]

2.4.6. PREVALENCIA LOCAL DE LA RESISTENCIA

En la práctica clínica, además del espectro antibacteriano, perfil farmacocinético y propiedades farmacodinámicas, es esencial conocer la prevalencia local de las resistencias de las principales bacterias frente a los antibióticos teóricamente indicados en su tratamiento. [16]

2.5. AMOXICILINA

Siendo la amoxicilina el compuesto cuyo método de cuantificación se validará por espectrofotometría UV, es importante mencionar sus diferentes presentaciones, vías de administración y dosis.

Las presentaciones comercializadas que se usaron en el presente trabajo son las mostradas en tabla 1:

Tabla 1. Formulaciones farmacéuticas de amoxicilina empleadas en esta tesis.

AMOXICILINA 1000	LABORATORIOS ROEMMERS
<i>Amoxicilina</i>	
Composición: Cada comprimido recubierto contiene: Amoxicilina (como amoxicilina sódica estéril) 1000 mg.	
Acción Terapéutica: Antibiótico.	
Posología: Puede ser administrado por vía intramuscular, por vía intravenosa directa o por infusión (diluido en solución dextrosada). Cuando se utilice la vía intravenosa directa, administrar lentamente, durante 3 a 5 minutos. Salvo indicación médica las dosis recomendadas son las siguientes: Vía intramuscular: Adultos: 2 gramos / 24 horas, o sea: Una inyección de 1 gramo, dos veces al día, a intervalos regulares (cada 12 horas). Niños (con peso menor a 40 kg): 50 mg / kg / 24 horas, en término medio: Una inyección de 500 mg dos veces al día, a intervalos regulares (cada 12 horas). Lactantes: 50 mg / kg / 24 horas. En los lactantes menores de 3 meses no sobrepasar 1ml / kg / día de solvente intramuscular. Vía intravenosa: Según indicación: Adultos: 2 a 12 gramos / 24 horas. Niños y lactantes (1 mes a 15 años): 100 a 200 mg / kg / 24 horas.	
Presentaciones: Envase conteniendo 1 frasco ampolla y 1 ampolla con disolvente.	
RODINAC BIOTIC	GEMINIS FARMACEUTICA
<i>Amoxicilina, trihidrato - Diclofenac, potásico</i>	
Industria Argentina	
Composición: Cada comprimido recubierto contiene: Amoxicilina (como Amoxicilina trihidrato) 500 mg; Diclofenac Sal Potásica 25 mg.	
Acción Terapéutica: Antibiótico. Analgésico y antiinflamatorio	
Presentaciones: 8 y 16 comprimidos recubiertos.	
AMIXEN PLUS	LABORATORIOS BERNABO
<i>Amoxicilina, trihidrato - Diclofenac, potásico</i>	
Composición: Cada comprimido recubierto contiene: Amoxicilina (como trihidrato) 500 mg; Diclofenac Potásico 25 mg.	
Acción Terapéutica: Antibiótico. Antiinflamatorio. Analgésico.	
Posología: La posología orientativa habitual es la siguiente: 1 comprimido cada 8 horas o según indicación médica.	
Presentaciones: Envases conteniendo 8 y 16 comprimidos recubiertos.	
GLIFAPEN	RONNET LABORATOIRES S.A.
<i>Amoxicilina, trihidrato - Diclofenac, potásico</i>	
Composición: Cada comprimido recubierto contiene: Amoxicilina (como trihidrato) 500 mg; Diclofenac Potásico 50 mg. <i>Excipientes:</i> Estearato de Magnesio, Celulosa Microcristalina, Croscarmellosa Sódica, Opadry II y Laca aluminica Azul Brillante c.s.	
Acción Terapéutica: Antibiótico bactericida asociado a un antiinflamatorio no esteroide.	
Posología: 1 comprimido recubierto cada 8 horas.	
Presentaciones: Envases que contiene 8, 16, 500 y 1000 comprimidos recubiertos.	
Especialidad medicinal autorizada por el Ministerio de Salud. Certificado N° 50.376.	

Se debe recalcar que la amoxicilina tiene mejor absorción por vía oral que parenteral y que guarda parentesco farmacológico y clínico cercano con la ampicilina, absorbiéndose más rápida y completamente por vías gastrointestinal en relación con la ampicilina lo cual

constituye la principal diferencia entre uno y otro. El espectro antibacteriano de la amoxicilina es esencialmente idéntico al de la ampicilina con la excepción importante que aquella es menos eficaz que la segunda contra la shigelosis.

Las concentraciones máximas de amoxicilina en plasma son de 2 a 2,5 veces mayores que ampicilina después de la ingestión de la misma dosis. Los valores se alcanzan en el término de dos horas y son en promedio 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cuando se administran 250 mg. Los alimentos no interfieren en la absorción del antibiótico. La vida media de la amoxicilina es similar a la de ampicilina, pero las concentraciones efectivas de la amoxicilina oral son detectables por un lapso dos veces mayor que en el caso de la ampicilina por su absorción más completa. En promedio, un 20 % de la amoxicilina se liga a proteínas plasmáticas. Gran parte de una dosis del antibiótico se excreta en su forma activa en la orina. [21].

2.6. METODOLOGÍA DE CALIBRACIÓN MULTIVARIADA

2.6.1. INTRODUCCIÓN

El empleo de herramientas multivariadas ha tenido un gran aporte en el estudio de la Química Analítica. Los precursores en estas metodologías analíticas fueron Bruce Kowalsky (Estados Unidos) y Svanden Wold (Suecia) en la década del '80, quienes sentaron precedentes en el tema. A partir de entonces, el desarrollo de nuevas metodologías multivariadas ha tenido un crecimiento relevante, sobre todo a partir de 1990 con el desarrollo de nuevas tecnologías en programas y sistemas de computación. Hoy en día en todo el mundo surgen nuevos trabajos referidos a calibración multivariada para diferentes tipos de muestras y analitos de interés.

En la actualidad, la calibración multivariada es utilizada como herramienta no solo en Química Analítica, sino también su empleo se extiende a otras disciplinas como la economía (econometría), biología (biometría) y diseño de fármacos (QSAR de su sigla en inglés *Quantitative Structure Activity Relation*) [23].

La calibración multivariada es una serie de herramientas matemáticas modernas aplicadas al análisis químico en forma selectiva cuando se utiliza más de una medida de respuesta y más de un analito para cada muestra. Su uso se extiende tanto sea en la

cuantificación de constituyentes mayoritarios como en el análisis de microcomponentes, para un gran número de metodologías instrumentales tales como NIR-FT, cromatografía de gases, cromatografía de líquidos y más ampliamente usada en la absorciometría molecular UV-Visible, entre otras [24].

La calibración multivariada es usada para el desarrollo de un modelo matemático-cuantitativo con el objeto de poder obtener una predicción de las propiedades de interés en una muestra (y_1, y_2, \dots, y_q , siendo y , por ejemplo, la concentración de diversos analitos de interés) desde un número de variables respuesta iniciales (x_1, x_2, \dots, x_p , siendo x por ejemplo, medidas de absorbancia a diferentes longitudes de onda). Tanto sea el número de propiedades de interés como el número de variables iniciales óptimas, deben ser determinadas en forma meticulosa, ya que cuando el modelo obtenido es simple (con un bajo ajuste) son introducidos errores sistemáticos, o bien cuando es muy complejo (sobreajustado) se pueden obtener errores aleatorios significativos [25].

El ejemplo más sencillo para el análisis espectrofotométrico de una mezcla con el objeto de medir la concentración de dos o más de sus constituyentes en calibración multivariada, es la regresión lineal múltiple (MLR de su sigla en inglés). En esta metodología se eligen un número de longitudes de onda (variables x) proporcionales al número de analitos de interés (variables y) y en donde la absorbancia en las longitudes de onda seleccionadas sea máxima para un componente y mínima para el resto. En este caso, la resolución de la mezcla puede realizarse manualmente resolviendo un sistema de ecuaciones con n variables respuesta y $n-1$ variables de interés.

En términos generales, la calibración uni o multivariada reemplaza la medida de la propiedad de interés por una que es más accesible y suficientemente exacta a través del uso de modelos analíticos y matemáticos adecuados. Un modelo de calibración requiere la formulación de los objetivos de estudio, adecuado diseño experimental, selección del modelo con mejor ajuste, estimación de sus parámetros y de la precisión de las predicciones.

En calibración uni o multivariada el procedimiento analítico general esta constituido por dos grandes etapas:

1. Tratamiento de la muestra: en donde se deben realizar algunos procedimientos químicos y/o físicos de diversa complejidad a fin de obtener el acondicionamiento de la muestra y del sistema, donde una cantidad física medible es correlacionada con una cantidad química a ser medida.

2. Cuantificación: El proceso de cuantificación en calibración uni o multivariada consta de tres etapas [24]:
- a) *Modelado o calibración*: en la que se estudia el comportamiento del método con el objeto de encontrar una función matemática que describa el modelo de dicho comportamiento ($y = f(x)$), a partir de dos conjuntos de variables donde y es la variable dependiente y x , la independiente. En la etapa de calibración, la serie de datos utilizados aquí se conoce como conjunto o “set” de calibración y los parámetros del modelo se conocen como coeficientes de regresión o sensibilidades. El uso de un modelo de calibración puede basarse en la aplicación de una relación teórica establecida (la ley de Lambert-Beer en espectrofotometría, la ecuación de Ilkovic en polarografía, la ecuación de Nernst en potenciometría, etc.) o bien puede resultar de una aproximación empírica, surgida de la experiencia del analista. En los métodos instrumentales de análisis la calibración es una función obtenida a través del ajuste entre un modelo matemático con un conjunto de datos obtenidos experimentalmente. Por inversión de la función de calibración se obtienen las variables de interés.
 - b) *Predicción*: consiste en obtener las variables dependientes de las muestras de interés que permiten predecir el valor de las variables independientes conocidos los coeficientes de regresión. En la etapa de predicción el conjunto de datos usados en ella constituye el conjunto o set de predicción.
 - c) *Validación*: en donde la operación de predicción se realiza con un conjunto de muestras de composición conocida y el nuevo grupo se conoce como conjunto o set de validación. Esta etapa es de utilidad a fin de conocer el error asociado al modelo en la etapa de predicción y evaluar la capacidad del mismo.

En los casos en que el instrumento registra la señal en función de una sola variable (instrumentación con metodologías clásicas) la calibración resulta sencilla y consiste en la búsqueda de una función matemática que vincule el valor de la medida (respuesta instrumental) con el valor de la variable (concentración) para un conjunto de muestras de composición conocida (sistema univariado).

Una recta constituye la función de calibración más simple y frecuentemente utilizada, donde los parámetros de la ecuación de la recta son las sensibilidades que definen los parámetros del modelo.

Sin embargo, la moderna instrumentación analítica en la actualidad permite obtener en un período de tiempo breve una gran cantidad de información, como por ejemplo la fluorescencia molecular, absorciometría molecular y diferentes técnicas acopladas como la cromatografía líquida con detector de diodos en línea, HPLC-DAD y la cromatografía de gases con detector de masas, GC-MS, que generan conjuntos de datos en función de dos o más variables (sistemas tridimensionales) [24].

El uso frecuente de una sola señal o un solo valor de la variable independiente produce una importante pérdida de información relevante. Pero el uso de un número importante de variables independientes permite obtener mucha más información sobre la muestra si el conjunto de datos es tratado adecuadamente mediante el uso de herramientas multivariadas.

Los métodos de calibración multivariada involucran a más de una variable independiente ($p > 1$), a diferencia de la calibración univariada en donde solamente hay una única variable ($p = 1$). Esta diferencia abre nuevas posibilidades como por ejemplo el uso de todas o gran número de longitudes de onda en un espectro completo como mecanismo de calibración y predicción, en vez de la señal simple a la longitud de onda más sensible. El uso de información espectral completa puede permitir mejores predicciones, pero también existe la posibilidad de que regiones espectrales poco o nada relevantes sean incluidas en el modelo durante la calibración. Sin embargo el uso de más de una variable independiente permite la estimación de más de una propiedad dependiente ($q > 1$) y la corrección de covarianzas indeseables (interferencias). En definitiva, esta es la mayor motivación para realizar mediciones multivariadas.

En calibración univariada no es posible corregir interferencias sin información adicional, pero con datos multivariados, la oportunidad surge al separar la información relevante para las respectivas propiedades, de las variaciones no relevantes o ruidos aleatorios [25].

En calibración multivariada, la precisión del resultado final no depende tanto de la precisión de los datos o variables originales, ya que a veces la medida absoluta o precisa de cada variable individual puede ser irrelevante para el propósito del análisis.

En la espectroscopía de reflectancia difusa en infrarrojo cercano (NIRS) no importa obtener lecturas de absorbancias aceptadas universalmente a las mismas longitudes de onda individuales, sino que el fin último es predecir el contenido de proteína en cierto tipo de muestras de trigos. Por ello, si bien la reflectancia o transmisión NIR desde las muestras

intactas parecen sumamente confusas, la calibración multivariada convierte varias longitudes de onda útiles en información precisa y relevante.

En ciertas aplicaciones, la calibración multivariada no surge como un detallado entendimiento de la relación entre variables dependientes e independientes, por lo que la habilidad para interpretar un modelo no es un requerimiento ni condición necesaria. Esto no impediría la exploración de conocimientos previos accesibles sobre el problema durante el modelado de la calibración. Un modelo que puede ser adecuadamente interpretado ciertamente agrega valor y confianza al resultado de la calibración [25].

El número de posibles aplicaciones de modelado predictivo es virtualmente ilimitado. La mayor aplicación actual se centra en el área de la química analítica, sobre todo en el desarrollo y aplicación de modelos de calibración predictivos con fines cuantitativos. Tal es el caso de la determinación simultánea de la concentración de varios analitos en una mezcla multicomponentes donde se puede elegir la metodología más adecuada a partir de un gran arsenal de métodos espectroscópicos (por ejemplo, UV-Visible, IR, NIR, XRF, NMR). Por otra parte, el uso de múltiples variables en línea resulta ser otra posibilidad muy interesante y depende casi exclusivamente de la aplicabilidad de modelos de calibración multivariada para el monitoreo cuantitativo de los sistemas o procesos de interés. Por ejemplo, la aplicación de espectroscopía de infrarrojo cercano para analizar pequeñas muestras en sistemas en línea o sistemas discontinuos ha encontrado un uso extendido en las industrias químicas y en las industrias de alimentos. La metodología es útil para caracterizar e identificar propiedades de productos relacionados a su composición, cuyo análisis por metodologías clásicas puede resultar costoso, por ejemplo determinación del número de octanos en combustibles, valores de yodo y grado de insaturación en grasas y aceites o cristalinidad de polímeros.

Otras aplicaciones por fuera del campo de la química analítica son la predicción de propiedades farmacológicas o bioquímicas desde parámetros estructurales (QSAR), la comprensión de perfiles sensoriales y organolépticos desde datos fisicoquímicos en investigaciones de alimentos y la obtención y uso de modelos a partir de datos ambientales [25].

La calibración multivariada puede estimular el desarrollo de nuevo instrumental analítico, a través de su incorporación a nuevos y más sofisticados equipos, como así también incrementar la capacidad analítica y la precisión de los instrumentos tradicionales actuales.

La aplicación de metodologías de calibración multivariada al tratamiento de datos analíticos requiere que el analista conozca de los fundamentos matemáticos, como así también del sistema analítico de estudio, para que en conjunto los resultados sean comparables con otras metodologías.

Los sistemas de calibración multivariada mas utilizados en la Química Analítica son:

- Análisis de Componentes Principales (PCA de *Principal Components Analysis*)
- Regresión de Componentes Principales (PCR de *Principal Components Regression*)
- Regresión por Cuadrados Mínimos Parciales (PLS de *Partial Least Square Regression*)

De los anteriores, el más frecuentemente utilizado en Química Analítica para fines cuantitativos es el PLS. El PCA se lo utiliza a menudo para clasificación de conjuntos de muestras, a partir de sistemas predefinidos, por lo que su uso se limita al análisis cualitativo. Tal es el caso de clasificar vinos utilizando como variables caracteres organolépticos y fisicoquímicos.

El PCR se puede utilizar para cuantificación de analitos, pero en sistemas reales puede tener el inconveniente de no considerar adecuadamente interferencias desconocidas, ya que considera los errores aleatorios de todo el sistema en conjunto (de la matriz de respuesta y de la matriz de concentraciones). Como ejemplo, el PCR puede utilizarse en sistemas sencillos y conocidos y como herramienta en sistemas en línea para control de calidad en la industria, en donde no ha de esperarse la incorporación de sustancias interferentes o cambios importantes en la composición que puedan afectar la variabilidad del sistema en el modelo.

El PLS tiene la ventaja frente al anterior, de tener en cuenta interferencias que no hayan sido previstas durante la confección del modelo, ya que evalúa en forma independiente los errores de la matriz de respuesta por un lado y los de la matriz de concentraciones por el otro, lo que le da una mayor versatilidad debido a que es más factible su aplicación a sistema reales. El PLS se ha aplicado a un amplio rango de muestras para determinar diversos analitos de interés en ellas [26-37].

2.6.2. CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS MULTIVARIADOS

Como se explicó anteriormente, las metodologías de calibración multivariada presentan diferencias que pueden ser notables tanto sea a los requisitos del modelo a aplicar y a las exigencias del cálculo implicado en el proceso de calibración [24].

La selección de un dado método dependerá del tipo de problema, del conocimiento previo del sistema y de los datos disponibles.

Es posible realizar la siguiente clasificación entre los métodos de calibración multivariada:

- Lineal - No lineal
- Selección - Espectro completo
- Directa - Indirecta
- Inversa - Clásica (reversa)
- Rígidos - Flexibles

2.6.2.1. CLASIFICACIÓN LINEALES – NO LINEALES

La diferencia fundamental entre sistemas lineales y no lineales es la existencia o suposición de funciones lineales o no lineales entre las variables X . Un método de calibración lineal puede escribirse como lo muestra la ecuación 2.1:

$$y = b_0 + \sum^n b_1 x_1 + e$$

Ecuación 2.1.

donde los parámetros b_0 y b_1 pueden ser determinados a partir de los datos del conjunto de calibración.

Un ejemplo de calibración en un método no lineal es la ecuación 2.2.:

$$y = a x^b + e$$

Ecuación 2.2.

Sin embargo, cuando un sistema de este tipo no es el apropiado, se puede realizar un pre-procesamiento no lineal y transformarlo en un modelo lineal.

2.6.2.2. CLASIFICACIÓN SELECCIÓN – ESPECTRO COMPLETO

En calibración multivariada una de las decisiones más importantes es la de utilizar todas las variables X respuesta posibles o solo unas pocas. Dependiendo de la complejidad del sistema a analizar, algunos de los métodos usados en la práctica pueden emplear un

pequeño número de variables e ignorar el resto, por razones puramente de cálculo. Por otra parte los métodos de espectro completo pueden usar todas las variables disponibles significativas.

La distinción entre selección y espectro completo es importante cuando las variables son altamente colineales. En este caso, la utilización de todas las variables puede ser inútil y resulta más adecuado reducirlas en forma significativa, ya que en este caso hay información reiterativa o repetitiva en muchas de las variables iniciales.

2.6.2.3. CLASIFICACIÓN DIRECTOS – INDIRECTOS

La distinción entre ambas es determinada en función de la información previa. En la calibración directa los parámetros del modelo son conocidos a priori y se pueden usar para definir la función en situaciones más bien ideales. Un ejemplo de esta situación puede ser la resolución espectrofotométrica de una mezcla de componentes conocidos a partir de los espectros de los componentes puros. Pero sin embargo la presencia de interferentes, ruido o respuesta no lineal, de interacciones entre los constituyentes, etc., limita cualquier posibilidad de uso. Por ello su utilización queda restringida a sistemas puntuales ideales o casi ideales.

En algunas situaciones no es posible obtener los espectros de todos los componentes en una disolución. En otras, algunos constituyentes pueden modificarse a través de reacciones transformando sus características. Además puede ocurrir que algunas interferencias no pueden aislarse o simplemente se desconoce por completo su existencia. En todos estos casos, la calibración indirecta ofrece una alternativa más viable y factible de aplicar. Este es un tipo de calibración más empírico que requiere un conjunto de patrones de concentración conocida de los constituyentes a determinar. Estos datos se utilizan para generar un modelo que permita realizar la predicción de las características del componente de interés, considerando la presencia de interferencias en el mismo modelo. Para ello no es necesario conocer ni los espectros ni las concentraciones de las distintas interferencias. La única condición es que en la calibración los patrones deben elegirse o prepararse de tal manera a fin de que en ellos estén representados lo mejor posible todos los interferentes.

Dado que en este caso se realiza una estimación estadística de los parámetros desconocidos del modelo de calibración (interferencias) a partir de mezclas de composición conocida, se requiere una mayor cantidad de datos que la anterior (mayor cantidad de patrones y la mayor cantidad de variables independientes relevantes posible).

Puede también existir una situación intermedia en que algunos parámetros son conocidos a priori y otros se determinan a partir de los datos de calibración.

2.6.2.4. CLASIFICACIÓN INVERSOS – CLÁSICOS

La diferencia entre ambas se establece según el diseño del modelo de calibración. Ello depende de si se define una ecuación de Y en función de X o bien de X en función de Y . La notación clásica para expresar un modelo para un conjunto de objetos esta representada en la ecuación 2.3.:

$$X = Y K + E$$

Ecuación 2.3

donde X representa la matriz de datos espectrales, Y la matriz de concentraciones de los analitos, K es la matriz de espectros unidad de los analitos y E representa los errores del modelo y ruido aleatorio. Si K no es conocido previamente se puede determinar de una manera indirecta.

Este tipo de modelos constituyen los sistemas más básicos de calibración y de ahí su distinción de clásico. Sin embargo, si el principal objetivo de la calibración es realizar la predicción de la matriz Y , parece más lógico y adecuado definir un modelo de calibración inversa en donde se defina Y en función de X . En este modelo se realiza una regresión de los datos de Y sobre las variables X , como se muestra en la ecuación 2.4:

$$Y = X B + E$$

Ecuación 2.4.

donde X representa la matriz de datos espectrales, Y la de concentraciones de los analitos de interés, B es la matriz de los coeficientes de regresión y E la de los residuales (errores asociados al modelo, ruido instrumental, errores operacionales, etc.).

2.6.2.5. CLASIFICACIÓN RÍGIDOS – FLEXIBLES

Pueden surgir por combinación de características de los ya citados. En los primeros, el modelo definido por el número de variables usadas (patrones, muestras, componentes del sistema, nivel de ruido, etc.), queda rígidamente establecido y solo funcionan

correctamente cuando se cumplen todas las premisas del mismo. La incorporación de una nueva fuente de variación no considerada durante el modelado puede causar graves distorsiones y errores considerables en la predicción. En los modelos rígidos se realiza una regresión de las variables sobre tantos patrones como analitos hay en la muestra.

En los métodos flexibles, por el contrario, se realiza la regresión de las variables sobre un número de patrones que puede ser distinto al de analitos de interés, por lo que estos métodos son más estables y están menos sujetos a distorsión o error por la presencia de otra fuente de variación, pudiendo soportar pequeñas variaciones sin afectar significativamente la predicción [24-25].

2.6.3 DIFERENCIACIÓN ENTRE METODOLOGÍAS PLS Y PCR

Los cuadrados mínimos parciales (PLS de *Partial Least Square*) [38-39] y la regresión de componentes principales (PCR de *Principal Component Regression*) son los métodos de calibración multivariada más ampliamente usados en Química Analítica.

Ambos hacen uso de la calibración inversa [40] en donde es posible calibrar los componentes deseados mientras implícitamente se modelan las otras fuentes de variación. La estimación del modelo de calibración inversa involucra la inversión de una matriz típicamente inestable. Tanto el PLS como el PCR resuelven el problema de esta inversión reemplazando las variables originales con combinaciones lineales de dichas variables (factores).

La diferencia entre PLS y PCR radica en cómo son calculados estos factores [24, 38]. Dadas las dos aproximaciones para resolver el problema de la calibración inversa, las ventajas sobre la regresión lineal múltiple (MLR de *Multiple Linear Regression*) son varias. El MLR puede generar modelos sencillos pero limitados por el poco número de variables que es capaz de utilizar. Las ventajas de usar más variables son:

- El modelo resulta ser más sensible a la detección de muestras que son inusuales comparadas con el conjunto de calibración (puntos discrepantes o outliers) [24], lo cual permite descartar a priori tales puntos anómalos.
- Las técnicas de espectro completo (uso de todas las variables posibles) poseen la ventaja multivariada [24, 38]. Esto está relacionado a la señal promediada, donde la desviación estándar es reducida por un factor de \sqrt{n} cuando el promedio de n determinaciones es usado en lugar de una simple medida. Con datos multivariados la señal promediada toma lugar cuando alguna medida cercana redundante es usada para construir el modelo [38, 41]. Esto es análogo a la cuantificación en cromatografía, ya

que la determinación de la concentración de cierta especie a través de la medida del área del pico, se opone a la relacionada a la altura del mismo [39]. Esto se debe a que la precisión del área es usualmente mucho mejor que la precisión de la intensidad en un dado punto.

En la metodología PLS existen dos aproximaciones que pueden ser usadas para desarrollar un modelo de calibración para los analitos de interés. Usando el término PLS-1, se generan modelos separados para cada analito. Con PLS-2, un solo modelo se construye usando todos los analitos simultáneamente. En este último caso se deben elegir adecuadamente las condiciones y número de componentes PLS a utilizar en el modelo final [24- 25, 38].

Tanto sea para PLS-1 como para PLS-2 en los modelos resultantes están implícitos todas las interacciones que se producen dentro del sistema, como la competencia de los analitos para la formación de un dado complejo, efecto de interferentes, ruido o fondo instrumental, etc.

El utilizar PCR o PLS dependerá del analista y de su inclinación por uno u otro método. Muchos estadísticos prefieren PCR porque está estadísticamente bien estudiado y definido, mientras que muchos científicos no estadísticos encuentran la aproximación PLS más fácil de entender conceptualmente. También muchos quimiométricos y otros analistas prácticos de datos prefieren PLS porque es efectivo y provee resultados que son más fáciles de interpretar por ser menos complejos, debido a la utilización de solo unas pocas componentes o factores PLS.

A menudo PCR puede dar errores de predicción tan bajos como el PLS, pero usando más componentes para confeccionar un modelo. Sin embargo la solución PCR es más estable, ya que el error en la predicción se aplanan alrededor del óptimo y no comienza a incrementarse debido al temprano sobreajuste. PLS es más sensible al sobreajuste, por lo que se torna crucial encontrar el número óptimo de componentes PLS.

PLS-2 es un método natural para comenzar cuando hay muchas variables de respuesta X (de aquí en adelante la definiremos como variables R). Rápidamente da una visión general de los patrones base y se observa si hay correlación significativa entre las variables R .

También PLS-2 puede conducir a mejores resultados si R es colineal, porque utiliza toda la información disponible en R . Sin embargo, esta no es una situación muy común. El inconveniente es que se pueden necesitar diferentes números de componentes para las diferentes variables R , lo que debe recordarse para la interpretación y predicción. Este es

también el caso para PCR con algunas variables R , dado que cada una puede necesitar muchos o pocos componentes.

Hay casos donde PLS-2 fracasa al intentar modelar algunas de las variables R . En esos casos se debe probar modelos PLS-1. Definitivamente se necesita interpretar cada modelo separadamente [25].

Finalmente se puede concluir que PLS probablemente dará resultados más rápidos, pero lo aconsejable es probar ambos PLS-1 y PLS-2. Este último es utilizado para una primera investigación, pero a menudo se necesitará del modelo PLS-1 separado para conseguir errores de predicción más satisfactorios [24-25, 42].

2.6.4. FUNDAMENTOS MATEMÁTICOS DEL PLS

El PLS es un procedimiento de modelado que estima simultáneamente los factores subyacentes en la matriz de concentraciones o variables dependientes Y (de aquí en adelante la definiremos como variables C) y en la matriz de variables independientes o respuestas R . Estos factores son usados para definir un nuevo subespacio en R que mejor ajuste a C .

En PCR, la rotación definida por los autovalores (scores) se utiliza para encontrar un subespacio en R que subsecuentemente modela a C . El PLS es similar a PCR, con la diferencia que los factores son elegidos para tanto las variables en C como en R . Esto se realiza utilizando las columnas de la matriz C para estimar los factores en R . Simultáneamente, las columnas de R son utilizadas para estimar los factores en C .

El PLS responde a un método inverso [38, 43] cuya característica principal es por lo general, que el modelo permite relacionar las medidas instrumentales y las concentraciones. La concentración se calcula en función de las respuestas, como lo muestra la ecuación 2.5 [24, 39-40].

$$R = TP + E \quad (a)$$

$$C = UQ + F \quad (b)$$

Ecuación 2.5.

donde los elementos T y U son matrices llamadas *scores* de R y C respectivamente y relacionan la información en la matriz de respuesta R con la matriz de concentraciones C , a través de la correlación que existe en las matrices de covarianza de R y C (o sea máxima elongación de los datos originales sobre el nuevo subespacio originado por los componentes PLS). Los elementos P y Q son matrices llamadas *loadings* de R y C

respectivamente, que indican las coordenadas de los datos iniciales sobre las nuevas componentes PLS. Un gráfico de los loadings en función de las longitudes de onda, permite observar cuales de ellas son relevantes en el modelo y, adicionalmente, se pueden tener curvas de loadings similares a los espectros, sobre todo cuando no existen fuentes importantes de variación. E y F son las matrices de error asociado al modelado de R y C para el modelo PLS.

Los scores T no son óptimos para estimar las columnas en R , pero son rotados a fin de poder describir simultáneamente la matriz C . El cálculo a través de herramientas PLS también da como resultado una matriz auxiliar conocida como matriz de pesos (W o *loadings weight*), que expresa la correlación entre las matrices U y R y es usada para calcular la matriz T .

En situaciones de idealidad, las fuentes de variación de R son exactamente iguales a las fuentes de variación en C , siendo por consiguiente idénticos los factores T y U para R y C . En aplicaciones reales, R varía en forma no correlacionada a la variación de C (ya que R depende de variaciones instrumentales y C de variaciones operacionales), por lo que $t \neq u$ (escritos ahora en letra minúscula porque representan los vectores que dan origen a las coordenadas de cada uno de los componentes PLS utilizados en el modelo). Sin embargo, cuando las matrices R y C son utilizadas para estimar los factores, existen entre ellos una nueva relación, definida por la ecuación 2.6.:

$$u = bt + g$$

Ecuación 2.6.

donde b es el término de relación interna entre u y t y g el error asociado. b es usado para calcular los factores subsecuentes en R . Si R tiene j vectores columna y C tiene k vectores columna, el vector t estará cerca de los j vectores de R y será un buen estimador para R . Por la misma razón, el vector u estará cerca de los k vectores de C y será un buen estimador para C . Si existe un buen modelado, que vincule a R y C , una gráfica de u vs. t para cada componente principal, deberá dar una línea recta que pase por el origen y por consiguiente, un valor de g muy pequeño. La figura 2.9 muestra como funciona el PLS teniendo en cuenta las anteriores consideraciones.

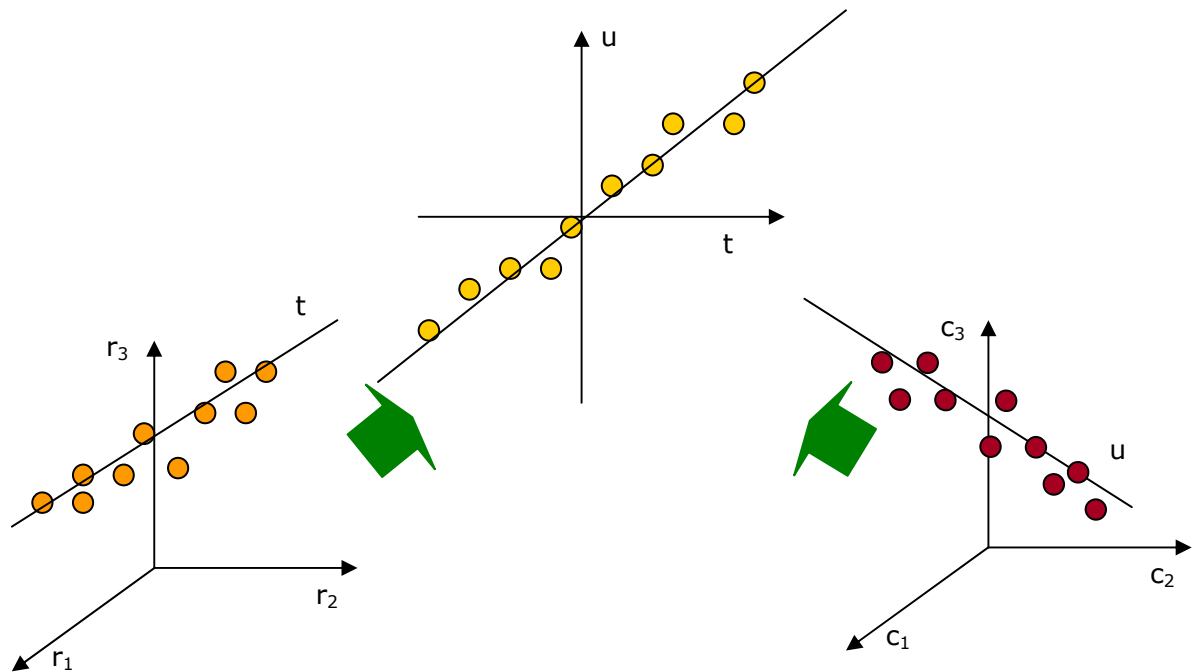


Figura 2.9. Descripción geométrica de operación para metodología PLS.

En la figura 2.9 se puede apreciar el funcionamiento de un sistema PLS para un caso simple con una matriz de respuesta con tres variables (por ejemplo absorbancia a 3 longitudes de onda) y una matriz de concentración con tres analitos de interés. La información de ambas matrices es luego condensada por los vectores t y u , las cuales por lo general presentarán una función lineal entre sí [40, 42]. Una vez obtenido el modelo matemático respectivo, a través del PLS se puede predecir los parámetros de interés (concentraciones de analitos) en una muestra incógnita. Dicha muestra producirá un vector de respuestas r_{desc} , el cual es operado matemáticamente en la ecuación 2.5 (a) para obtener un vector t_{desc} , con el cual se puede conocer con la ecuación 2.6 el vector u_{desc} , que finalmente es utilizado para conocer la matriz de concentraciones de la muestra incógnita c_{desc} utilizando la ecuación 2.5 (b). En definitiva, el modelo estará conformado por una serie de matrices y vectores ordenados por el programa, que operan matricialmente con los datos de respuestas o señales de la muestra incógnita.

El PLS opera matemáticamente a fin de que las direcciones de los primeros componentes PLS (definidos por t y u) puedan explicar la mayoría de la variación de la muestra, siendo esta variación la información relevante de la misma necesaria para el modelado. Para ello, PLS utiliza las covarianzas del sistema y son las que definirán la dirección de máxima elongación de los puntos y la dirección de los componentes PLS.

La consecuencia de esto es que la información inicial contenida a lo largo de n variables (por ejemplo valores de absorbancias de un barrido espectral completo), se ve

condensada en unas pocas nuevas variables ortogonales entre sí, con lo cual queda resaltada solamente la información útil con los primeros componentes PLS y la información redundante queda confinada en los últimos (definida por la matriz de errores). Si se seleccionan un número elevado de componentes PLS, el modelo se ajustará adecuadamente pero con el costo de tener incorporado en él gran cantidad de información irrelevante (sobreajuste), con lo cual las matrices de error se hacen pequeñas al utilizarse la información relevante e irrelevante. Por el contrario, si el número de componentes PLS seleccionado es muy pequeño, se corre el riesgo de dejar de lado información vital del sistema en estudio (subajuste) y las matrices de error del modelo se tornan grandes [25, 42].

En la figura 2.10 se representa el funcionamiento del PLS en términos generales para hallar los componentes PLS.

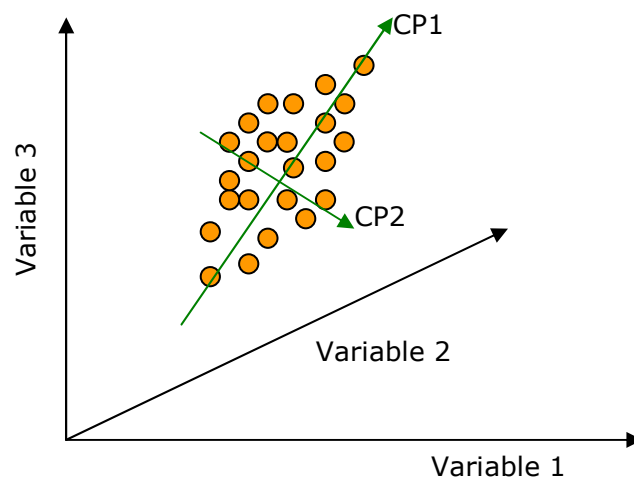


Figura 2.10. Dirección de los componentes PLS a partir de una nube de puntos tridimensional.

En el gráfico se observa claramente como opera el PLS para obtener un modelo a partir de una nube de puntos tridimensional. Se puede observar que el primer componente principal (CP1) tiene la dirección hacia la máxima elongación de la nube de puntos en las tres dimensiones del ejemplo (variables respuesta originales), definida por la matriz de covarianzas del sistema. El segundo componente principal tiene la dirección de la segunda mayor elongación de la nube en las tres dimensiones, ortogonal al CP1.

Cada componente principal que subsecuentemente surja en n dimensiones, será ortogonal a los anteriores, por lo que se generará un nuevo sistema de ejes cartesianos que se orientará hacia donde exista la mayor elongación de la nube de puntos y por ende,

mayor información. Por otra parte, se produce una sustancial reducción de variables ya que, como se aprecia en el gráfico, dos componentes PLS modelan a las tres variables originales y esto se hace más sensible en espacios n dimensionales con n variables con una reducción a unos pocos componentes PLS.

A continuación se expondrán algunos conceptos matemáticos de interés para un mejor entendimiento de la metodología PLS.

- a. *Varianza*: de una variable resulta una medida de la dispersión de los valores variables respecto a la media o cuan grande es el rango de valores que pueden tomar (ecuación 2.7.). Este concepto es de crítica importancia para pensar como llegar a los resultados.

$$\text{Var}(x) = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

Ecuación 2.7.

La raíz cuadrada de la varianza, la desviación estándar, que es generalmente usada, es también útil para expresar la medida de esta expansión en las mismas unidades de las medidas (ecuación 2.8.) [42]

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Ecuación 2.8.

- b. *Covarianza*. La covarianza entre dos variables, x_1 y x_2 es una medida de su asociación lineal. Si muchos valores de la variable x_1 se vinculan con muchos valores de la variable x_2 la covarianza será positiva. Y viceversa, si muchos valores de la variable x_1 se vinculan con pocos de la variable x_2 , la covarianza será negativa. Una gran covarianza (en valores absolutos) significa que existe una fuerte dependencia lineal entre las dos variables, mientras que si la covarianza es pequeña, luego las dos variables no son muy dependientes; esto es, si cambia la variable x_1 , esto no afecta mucho a la variable x_2 (ecuación 2.9.).

$$\text{COV}(x, y) = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{n - 1}$$

Ecuación 2.9.

La medida de la covarianza depende de las unidades de las variables. Por lo tanto, para comparar por igual dependencias lineales, se utiliza otra medida más práctica, la correlación [42].

- c. Correlación.* La correlación entre dos variables es calculada por división de la covarianza con el producto de sus respectivas desviaciones estándares, siendo simplemente una medida sin unidad de covarianza escalada. Es en general la más usada para comparar la independencia entre variables, debido a que las correlaciones son directamente comparables en cualquier unidad en que las variables son medidas. El coeficiente de correlación de Pearson, r , está definido por la ecuación 2.10.

$$r = \frac{\text{COV}(x, y)}{S_x S_y}$$

Ecuación 2.10.

donde $\text{cov}(x,y)$ es la covarianza entre las variables x e y . Siendo S_x y S_y las correspondientes desviaciones estándares de las mismas.

El valor r^2 es usado muy a menudo como una medida de la fracción de la varianza total que puede ser modelada por esta medida de asociación lineal. Los valores de correlación siempre se hallan entre -1 y 0 , y entre 0 y $+1$. Una correlación de 0 , significa que no hay correlación, no hay relación entre las variables; una correlación de $+1$ significa que hay una relación máxima positiva lineal entre las variables, y en una correlación -1 la relación es negativa e inversa [42].

Para hallar la máxima elongación en la nube de puntos n dimensional de las variables originales, el PLS utiliza las covarianzas de las medidas de C y R para obtener los vectores t y u que definirán posteriormente la orientación de los componentes PLS. El valor r^2 es un índice muy importante que definirá la calidad del ajuste del modelo PLS obtenido.

Como ya se dijo anteriormente, la ventaja de los modelos inversos (tal el caso del PLS), es que es capaz de predecir la concentración de una dada especie cuando existen fuentes de variación química y física presentes en el sistema. Es por ello que esta metodología fue empleada en el presente trabajo como herramienta multivariada para la cuantificación de amoxicilina en muestras reales de antibióticos comerciales.

2.6.5. TRATAMIENTO DE DATOS ANALÍTICOS POR PLS

El análisis de datos analíticos por metodología PLS requiere necesariamente de tres etapas:

- Confección del modelo o modelado (calibración)
- Validación del modelo
- Predicción (de muestras incógnita)

Los requerimientos del sistema para que la predicción sea posible es que dicho sistema de medida esté adecuadamente diferenciado de otras fuentes de variación, que la respuesta del instrumento sea lo suficientemente lineal con la concentración y que las experiencias de calibración y generación del modelo sean cuidadosamente planeadas [24, 39].

2.6.5.1. CALIBRACIÓN O CONFECCIÓN DE UN MODELO PLS

Como ya se comentó anteriormente, un modelo PLS es obtenido a partir de un determinado número de calibradores o patrones, los cuales contendrán en cantidades conocidas y variables, los distintos analitos de interés que se espera hallar en la muestra real. Si bien el PLS es capaz de generar modelos en los cuales los efectos por interferencias puedan estar implícitamente incorporados en él, lo más aconsejable es preparar los patrones de calibración con una composición lo más similar posible a la de la muestra, a fin de evitar resultados dudosos o engañosos.

Para la confección del modelo PLS existen ciertas herramientas de diagnóstico que son usadas para investigar ciertos aspectos de las series de datos: el modelo, los patrones y las variables.

El uso primario de la herramienta de diagnóstico de modelo sirve para determinar el número óptimo de componentes PLS del modelo.

La herramienta de diagnóstico de patrones es usado para estudiar las relaciones entre ellas e identificar posibles puntos discrepantes, debidos a errores de diversa índole (en la matriz de concentración, matriz de respuestas por ruido no modelado, etc.).

La herramienta de diagnóstico de variables es exactamente lo mismo que el anterior, pero inherente a las variables.

Los puntos discrepantes u outliers son patrones o variables atípicas. Si son resultados de medidas erróneas deben ser quitados del modelo, o éste no será el correcto. Pero por otro lado pueden ser valiosos si representan un fenómeno importante desconocido y en ese caso hay que conservarlos; el eliminarlos podría implicar un modelo incorrecto. La decisión final corre por cuenta exclusiva del analista. El problema de identificar puntos discrepantes puede resultar difícil. Los gráficos de % varianza explicada pueden ser usados con este propósito. Esto puede involucrar mucho trabajo, especialmente cuando hay muchas variables y/o patrones. Los gráficos de scores t en función de u son también apropiados para la detección de puntos discrepantes. El patrón en cuestión aparecerá muy separado del resto, con valores excesivamente altos o bajos.

A continuación se detallan las herramientas de evaluación anteriormente nombradas [39].

2.6.5.1.1. Raíz cuadrada del error medio de la calibración y porcentaje de varianza explicada

El primer diagnóstico para la evaluación de un modelo es el porcentaje de varianza explicada para los datos de concentración y medidas. El porcentaje de varianza explicada es la cantidad de varianza que define el modelo con un dado número de factores relativo a la varianza total del sistema. Este diagnóstico sirve para evaluar problemas con los datos, tales como errores significativos en los valores de concentración de referencia o desviaciones en la ley de Beer entre los espectros y las concentraciones.

Cuando algo de esto sucede, el diagnóstico surge por el hecho de que el porcentaje de varianza para la matriz de concentraciones C , es mucho menor que para la matriz de respuesta R para el mismo número de factores. Otro uso útil es ayudar a determinar el número de factores a utilizar en el modelo por comparación entre el porcentaje de varianza remanente y un nivel de ruido conocido en los datos espectrales y/o de concentración definidos por las matrices de error. El porcentaje de varianza explicada se calcula a partir de la raíz cuadrada del error medio de la calibración, RMSEC (de *Root Mean Square Error Calibration*) (ecuación 2.11.) y el factor r^2 que es el factor de regresión del modelo. El RMSEC debería disminuir a medida que se aumenta el número de componentes PLS utilizados para el modelo. Sin embargo, si el número de dichos componentes es demasiado elevado, puede incluir en ellos información irrelevante asociada con los ruidos del sistema.

$$\text{RMSEC} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_{i,\text{cal}} - y_{\text{cal}})^2}{n}}$$

Ecuación 2.11.

La figura 2.11. muestra un gráfico típico de porcentaje de varianza explicada acumulativa en función del número de componentes PLS, en donde se observa una tendencia máxima a partir del componente número 3 (en el ejemplo hipotético), lo que significa que el modelo está utilizando un alto porcentaje de información de los datos originales a partir del componente 3 [39, 42].

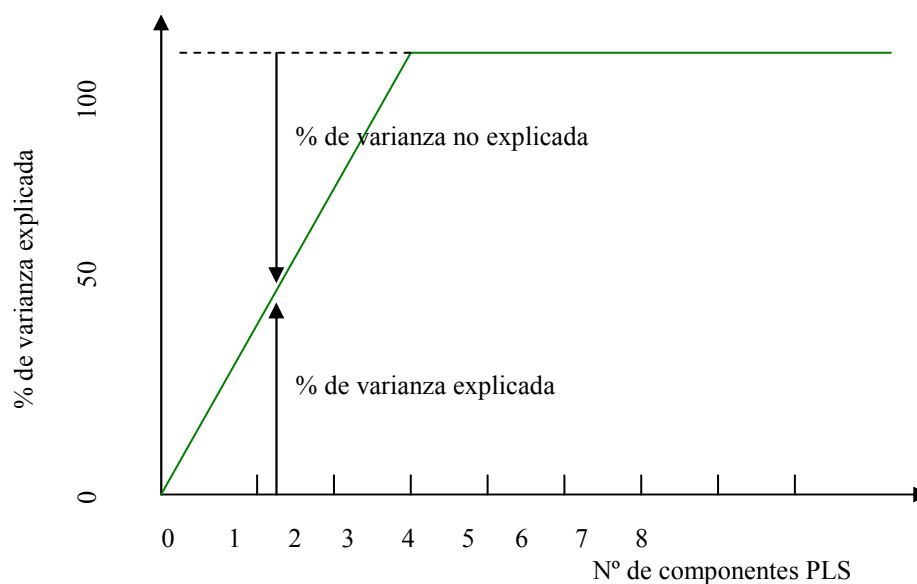


Figura 2.11. Porcentaje de varianza explicada en función del número de componentes PLS.

2.6.5.1.2. Raíz cuadrada del error medio de predicción

Otro parámetro de evaluación del modelo son los errores de predicción, que resultan medidas útiles para seleccionar el número óptimo de factores a incluir en el modelo. Esto es debido a que los modelos son a menudo usados para predecir la concentración en futuras muestras desconocidas. Esto se realiza a través de los datos de validación del modelo, que se explicará en el siguiente ítem. La estadística usada para cuantificar el error en la predicción es la raíz cuadrada del error medio de predicción (RMSEP de *Root Mean Square Error Prediction*), que se puede observar en la ecuación 2.12.

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{\text{nmuestras}} (c_i - \hat{c}_i)^2}{\text{n muestras}}}$$

Ecuación 2.12.

donde c_i es la concentración observada de la i ésima muestra predicha, \hat{c}_i es la concentración predicha para esa muestra y n -muestras es el número de muestras predichas.

En función de lo expuesto en 2.6.5.1.1. y 2.6.5.1.2., existe una primera aproximación que permite seleccionar el número adecuado de componentes PLS a fin de obtener un modelo lo más ajustado posible. Esto se logra graficando la varianza no explicada, lo que es lo mismo a la raíz cuadrada de error medio (RMSEC) y la raíz cuadrada del error medio de predicción (RMSEP) en función del número de componentes PLS (figura 2.12.). Con el mismo, se puede elegir con mayor certeza, el número de componentes PLS óptimos necesarios para la obtención de un modelo adecuado [39].

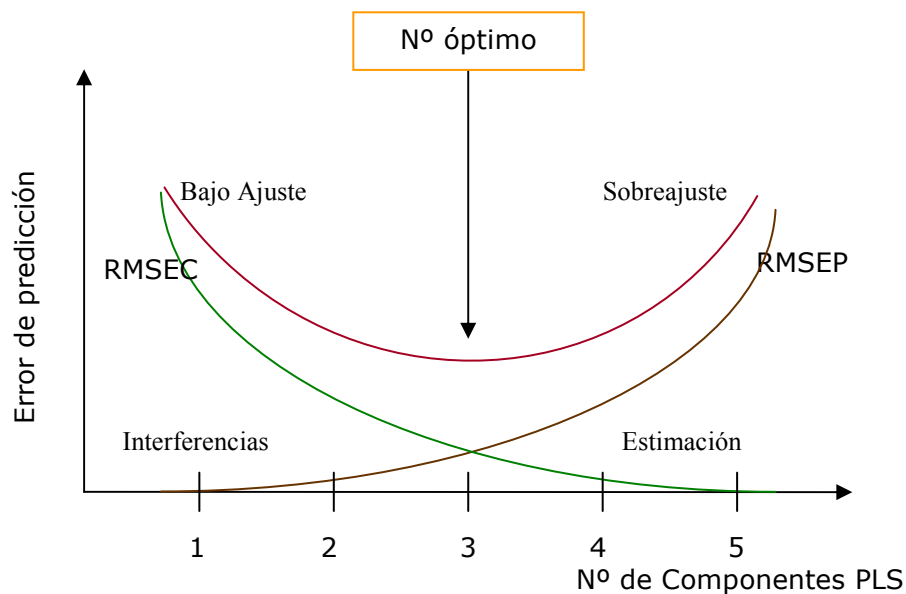


Figura 2.12. Estimación del número óptimo de componentes PLS para alcanzar el mejor ajuste del modelo.

2.6.5.1.3. Otros parámetros de evaluación del modelo

Existen, además de las nombradas recién, otras herramientas importantes en la evaluación del modelo. La Suma de Cuadrados del Error de Predicción (*PRESS* de *Prediction Error Sum of Squares*), es el error que surge como consecuencia del proceso de validación cruzada o *crossvalidación* del modelo, que se expondrá en el próximo ítem. El *PRESS* ofrece un criterio para definir el número de componentes PLS significativos del modelo. La ecuación 2.13 define matemáticamente al *PRESS*.

$$PRESS = \sum_i \sum_m [C_{im} - \hat{C}_{im}]^2$$

Ecuación 2.13

donde los subíndices i definen al i ésimo componente PLS, m corresponde al m ésimo analito de interés, C_{im} es la concentración experimental y \hat{C} corresponde a la concentración predicha del analito en los patrones de calibración.

Otro parámetro usado frecuentemente para evaluar al modelo es el factor Q^2 , que es la fracción de la variación total de la matriz R que puede ser explicada por cada uno de los componentes PLS y se calcula a partir del *PRESS*, como lo muestra la ecuación 2.14.

$$Q^2 = 1 - PRESS / SS$$

Ecuación 2.14

siendo SS la suma de cuadrados de las variables de R calculadas para cada uno de los componentes PLS. Finalmente, un último parámetro útil para definir las variables más significativas de la matriz de respuestas R es el factor Importancia de Variables en la Proyección (*VIP* de *Variable Importance in the Projection*). *VIP* calcula la influencia de cada k -ésima variable de la matriz de respuesta R sobre la matriz de concentraciones C y se calcula a través del factor Influencia de Variables (*VIN* de *Variable Influence*), tal como se muestra en la ecuación 2.15.

$$VIP_k = \sum [VIN]_k^2$$

Ecuación 2.15

2.6.5.2. Validación del modelo

Hay dos formas de generar un conjunto de validación para estimar los errores de predicción: validación interna (p.e. validación cruzada o crossvalidación) o validación externa (producir predicciones a partir de un conjunto separado de validación). La validación interna cruzada suele ser el método más usado por su sencillez.

Cuando se utiliza validación cruzada, la serie de datos de calibración original se divide en dos subconjuntos: calibración y predicción. Por ejemplo, la serie de datos original se divide a la mitad, usando la primera mitad de los datos para construir un modelo de calibración para predecir la segunda mitad. Los roles de los subconjuntos de datos son cambiados y se construye un nuevo modelo en donde la segunda mitad es usada para predecir la primera. De esta manera, cada una de las muestras en los datos es predicha una vez. Otro tipo de validación cruzada más común es el dejar *uno afuera*, donde los datos se dividen en subconjuntos conteniendo $n - 1$ muestras.

Las $n - 1$ muestras son usadas para construir el modelo y la muestra afuera es usada para la predicción. El proceso se repite hasta que cada muestra es dejada afuera una vez. Para grandes series de datos, esto puede llevar importante cantidad de tiempo, por ello puede ser más práctico dejar afuera varios subconjuntos. Hay que tener en claro que existe un límite para cuantas y cuales muestras pueden ser dejadas afuera debido a que la serie de calibración debe contener un adecuado conjunto de muestras para construir el modelo a cada paso [24, 39, 41].

En la validación externa, se utilizan patrones de calibración distintos a los utilizados para la confección del modelo. Estos patrones se ingresan al modelo como si fueran muestras a analizar y se determinan con ellos la capacidad predictiva del modelo realizado, evaluando las diferencias de concentración que surgen entre la predicción del modelo y la concentración conocida de los analitos en los patrones de validación. Con ello es posible calcular el error asociado a fin de considerarlo para la estimación de las concentraciones en las muestras reales.

2.6.5.3. Predicción

La última etapa en la metodología PLS consiste en la predicción, en donde se cuantificarán las concentraciones de los analitos de interés en las diversas muestras incógnitas, a través de un modelo optimizado y validado.

Matemáticamente, la predicción consiste en conocer las matrices P, Q, E, F y G mientras que con las matrices T y U se calcula el vector b, que surgen a partir del modelo con matrices R y C conocidas y conformadas por los patrones de calibración.

A partir de una muestra de concentración desconocida para las especies de interés, se obtendrá un vector respuestas r_{desc} , con el cuál, a partir de la ecuación $r = t p + e$ (definida ahora en términos vectoriales para describir una sola muestra) se puede calcular el vector t_{desc} . Como el vector b y g ya están dados por el modelo, con la expresión $u = bt + g$, con t_{desc} se calcula u_{desc} . Finalmente con la ecuación $c = uq + f$ (vectorial) y conocidos todos los miembros de la misma, es posible conocer el vector c_{desc} , que resulta ser un vector fila cuyos componentes corresponden las concentraciones de los analitos de interés previstos en el modelo [40].

2.6.6. PAQUETES ESTADÍSTICOS PARA EL EMPLEO DE LA METODOLOGÍA PLS

El análisis a través de metodología PLS requerirá la utilización de programas específicos para tal fin, debido a la complejidad de los cálculos que se deben realizar. Además tales programas pueden ser lo suficientemente accesibles como para facilitar la tarea al operador. Sin embargo, el uso de herramientas multivariadas requerirá del usuario, en general, un conocimiento lo más acabado posible de los fundamentos matemáticos necesarios, como así también del sistema que desee estudiar y del programa estadístico del que dispone, a fin de no obtener resultados incorrectos o falsos. Esto resulta algo muy importante ya que no es posible trabajar con estos programas sin una base sustentable, ya que los resultados que se obtengan pueden engañar al analista y emitirse resultados muy alejados de la realidad.

Existen en el mercado, un número importante de programas poderosos de computación que permiten el análisis multivariado de los datos analíticos. Además hay una oferta muy grande de programas estadísticos multivariados para diferentes propósitos. Esto obliga al analista químico que los usará, conocer cabalmente cada uno de ellos para que le permita realizar la selección del mejor programa sin gastar dinero en paquetes que le pudieran prestar poca utilidad.

El programa utilizado Unscrambler 6.11 [44] está diseñado con una interfase del usuario accesible que permite, entre otros aspectos, importar las matrices de datos desde cualquier planilla de cálculo, obtener gráficas espectrales (completas o acotadas), gráficos específicos referidos a los modelos obtenidos, que ayudan a interpretar y a optimizar los mismos en poco tiempo (si no existen otro tipo de fuente de error adicional).

Esto facilita enormemente la tarea del químico analítico para el tratamiento de datos y le evita considerables pérdidas de tiempo en la transcripción de los mismos, sumado ha ello la posibilidad de error que es posible cometerse durante el proceso por parte del operador, habida cuenta de que cada patrón o muestra puede estar constituido por cientos de datos.

El Unscrambler 6.11 permite realizar el tratamiento de datos analíticos bajo diversas formas de herramientas multivariadas. Las utilizadas en este trabajo son PLS-1 y PLS-2, pero también posee tratamiento de datos por medio de PCR y PCA (este último importante para clasificación por grupos a través de ciertas propiedades características, como así también permite encontrar propiedades ocultas relevantes que puedan afectar enormemente el análisis).

Otra característica interesante del sistema Unscrambler es la inclusión de un manual del usuario [45] sumamente accesible, con una gran diversidad de ejemplos para cada caso particular, lo cual facilita la interpretación y entrenamiento del analista. Por otra parte, el fabricante incluye un programa tutorial que esta basado en los ejemplos antes mencionados y con la misma interfase del usuario, que permite realizar un seguimiento más exhaustivo de todo el procedimiento y un mejor entendimiento del mismo paso por paso, lo cual redundo en un menor tiempo de aprendizaje por parte del analista neófito.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. REACTIVOS

3.1.1. SOLUCIONES ESTÁNDAR

3.1.1.1. SOLUCIÓN DE AMOXICILINA.

Se pesó 1,0000 g de amoxicilina trihidrato, se trasvasó a un matraz de 1000 mL y se adicionó agua desionizada hasta enrase.

3.1.1.2. SOLUCIÓN DE DICLOFENAC

Se pesó 1,0000 g de diclofenac sódico, se trasvasó a un matraz de 1000 mL y se adicionó agua desionizada hasta enrase.

3.1.1.3. SOLUCIÓN REGULADORA PH.

Se preparó esta solución reguladora de pH = 1 utilizando la tabla de Clark, a partir de soluciones estándar de HCl y KCl [46].

3.1.1.4. AGUA DEIONIZADA

Se obtuvo a partir de un sistema de ultrapurificación de agua Barnstead Easy Pure (USA) con una resistividad de 18 MΩ cm.

3.1.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS FARMACÉUTICAS COMERCIALES

Se obtuvieron por sonicación de una pastilla de cada muestra por 30 minutos. Luego se filtró y el filtrado se llevó a 1 litro con agua bidestilada. Posteriormente se realizaron las diluciones necesarias para que las concentraciones de amoxicilina se encontraran en el rango de calibración.

3.2 INSTRUMENTAL

3.2.1 MEDIDAS ABSORCIOMÉTRICAS

Las medidas absorciométricas y los datos espectrales correspondientes, se realizaron dentro del rango visible, en un espectrofotómetro marca Ocean Optics modelo CHEMUSB4 con sistema de detección por arreglo de diodo lineal y de configuración haz simple. Las celdas utilizadas en todos los casos fueron de cuarzo y con un camino óptico de 10 mm. Los datos se transfirieron y procesaron en el programa Unscrambler 6.11. Todos los blancos de lectura cero en escala del instrumento se realizaron con agua deionizada adicionada con solución reguladora pH 1.

3.2.2. MEDIDAS Y AJUSTE DE PH

Para las medidas de pH se utilizó un pH-metro HORIBA F42 de electrodo combinado de vidrio, con electrodo de referencia interna de Ag-AgCl.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. MODELO DE CALIBRACIÓN OBTENIDO A TRAVÉS DE REGRESIÓN POR MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLS)

El modelo de calibración fue obtenido utilizando un total de 25 patrones de calibración de Amoxicilina trihidrato, los cuales fueron adicionados con cantidades aleatorias de diclofenac sódico.

La figura 4.1 muestra el espectro completo de la amoxicilina trihidrato con una concentración de 120 ppm.

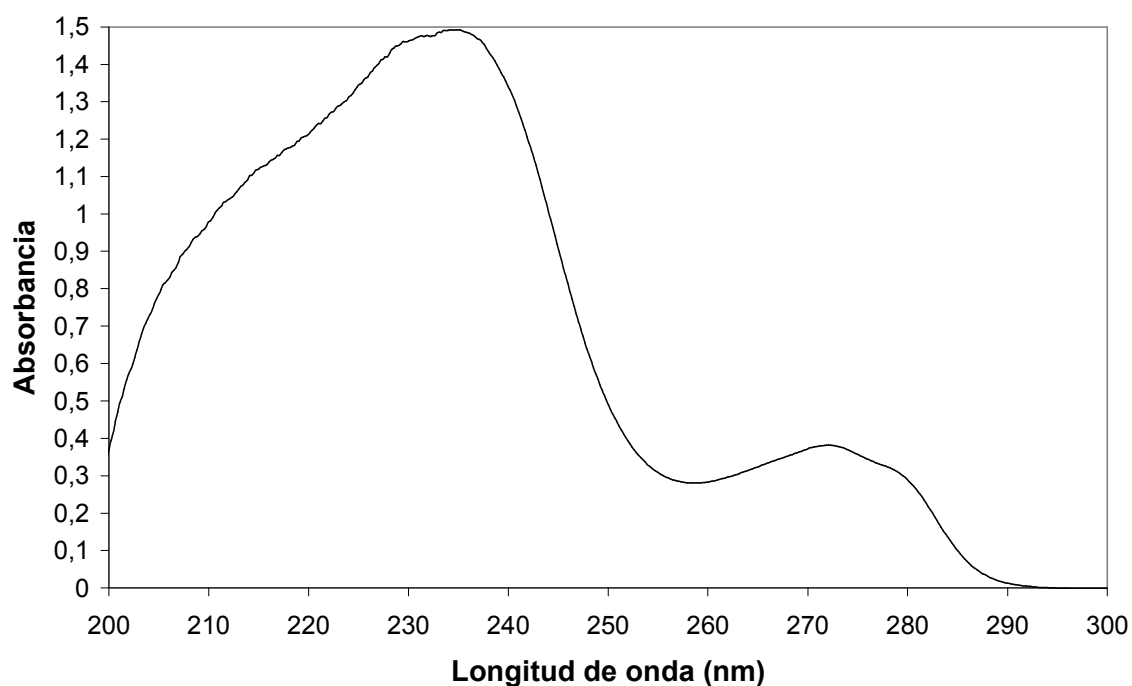


Figura 4.1. Curva espectrales de amoxicilina 120 mg/L

4.2. EVALUACIÓN DEL MODELO PLS

4.2.1. CALIBRACIÓN

Una vez conocidas las mejores condiciones analíticas para el desarrollo de la metodología, se iniciaron los estudios referidos al modelo PLS de calibración multivariada. La etapa de calibración del modelo se realizó a partir de patrones que se prepararon adicionando cantidades conocidas de amoxicilina y cantidades aleatorias de diclofenac (como interferente mas importante). Se prepararon un total de veinticinco patrones empleados para realizar la calibración. Los niveles de concentración empleados de amoxicilina estuvieron en el rango de 0 a 120 mg/L. La tabla 4.1 ilustra la matriz de calibración utilizada para la confección del modelo PLS a partir de patrones de amoxicilina.

Tabla 4.1. Conjunto de calibración utilizado para obtener el modelo PLS con 25 patrones

	Amoxicilina
Patrón 1	0.00
Patrón 2	30.00
Patrón 3	60.00
Patrón 4	90.00
Patrón 5	120.00
Patrón 6	0.00
Patrón 7	30.00
Patrón 8	60.00
Patrón 9	90.00
Patrón 10	120.00
Patrón 11	0.00
Patrón 12	30.00
Patrón 13	60.00
Patrón 14	90.00
Patrón 15	120.00
Patrón 16	0.00
Patrón 17	30.00
Patrón 18	60.00
Patrón 19	90.00
Patrón 20	120.00
Patrón 21	0.00
Patrón 22	30.00
Patrón 23	60.00
Patrón 24	90.00
Patrón 25	120.00

^a Concentración expresada en mg/L

Los patrones de la tabla 4.1 fueron leídos en el rango de interés de 200 a 300 nm, dando como resultado la matriz de respuestas, cuya gráfica se ilustra en la figura 4.2.

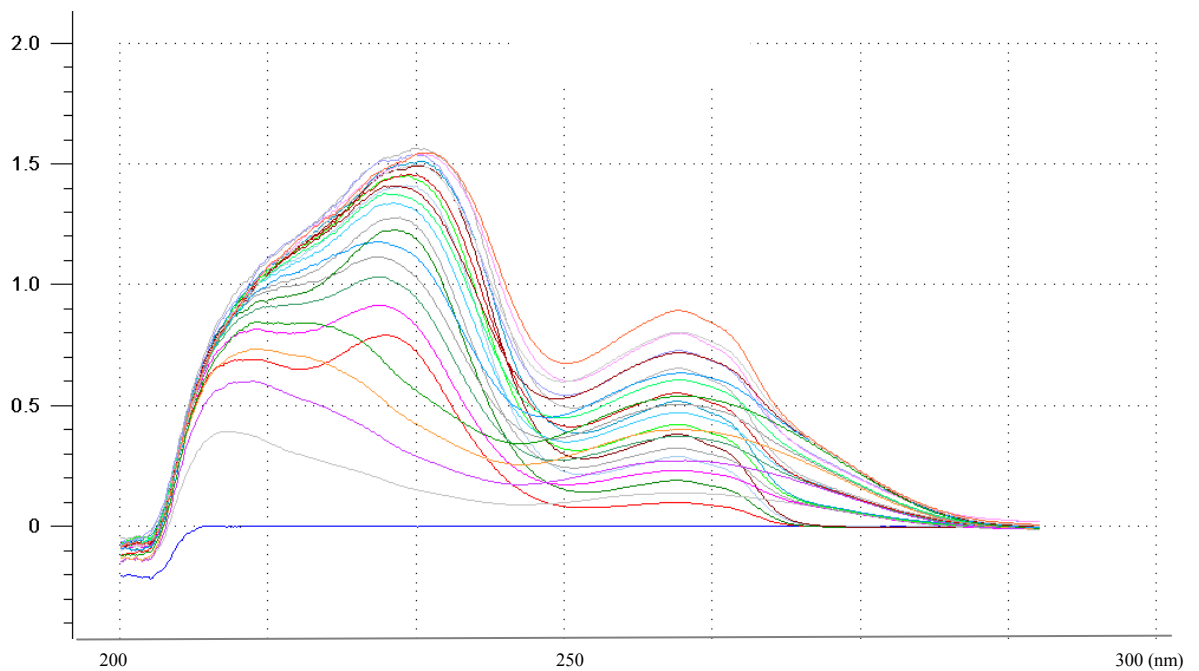


Figura 4.2. Curvas espectrales de los 25 patrones de calibración.

El modelo obtenido requirió de dos componentes principales para contener el 99 % de la información inicial relevante del sistema analítico en estudio. Esto se puede apreciar en la figura 4.3 donde se puede observar el % de varianza explicada en función del número de componentes principales en el modelo PLS1.

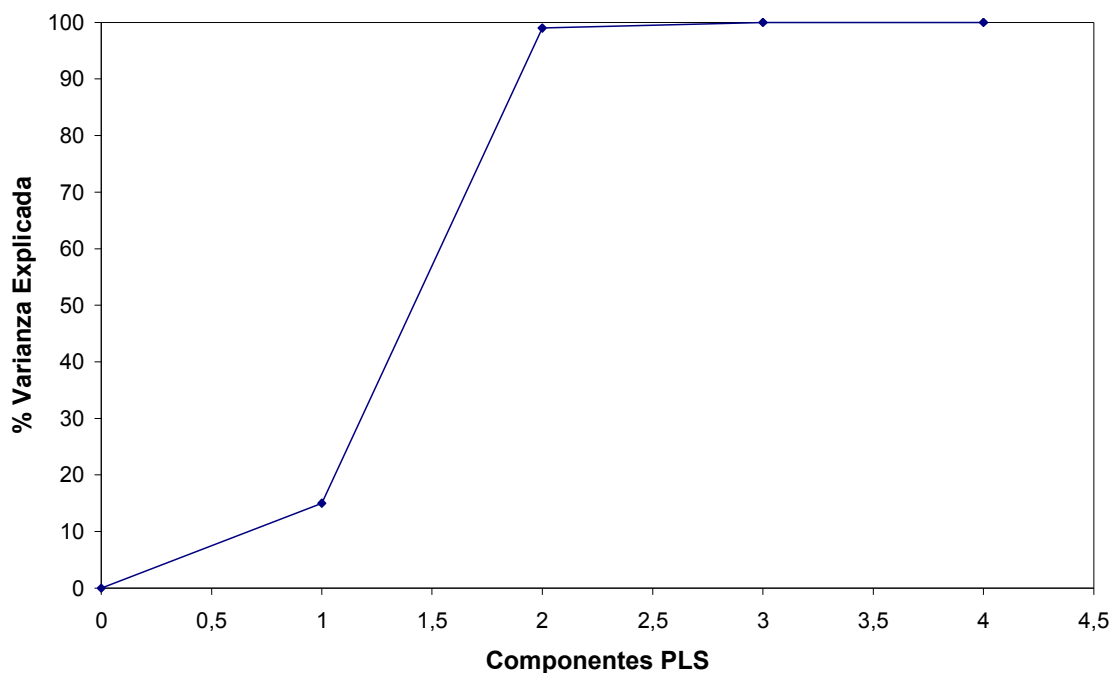


Figura 4.3. Porcentaje de Varianza explicada en función del número de componentes PLS.

4.2.2. VALIDACIÓN DEL MODELO PLS

4.2.2.1. MUESTRAS DE VALIDACIÓN

El modelo PLS obtenido fue validado por validación interna cruzada (cross-validation), utilizando el modelo resultante con mínimo error de validación. La validación confirmó un adecuado comportamiento del modelo, ya evaluado y optimizado durante la etapa de calibración.

Posteriormente, el modelo fue revalidado utilizando un conjunto o set de validación con patrones, cuya concentración de amoxicilina fue distinta a las empleadas en el conjunto o set de calibración. Los resultados de estos ensayos de validación se resumen en la tabla 4.2. En la misma se observan las concentraciones predichas por el modelo, las concentraciones de referencia (teóricas reales de cada patrón) y el porcentaje de error relativo. Se puede apreciar que el error máximo de validación obtenido fue menor al 10 %, error aceptable analíticamente para una metodología de bajo costo instrumental como la propuesta.

Tabla 4.2 Resultados de predicción en los patrones de validación para amoxicilina.

Patrón	Predicha (mg/L)	Referencia (mg/L)	% Error relativo
V1	18.160	20.000	-9.2
V2	33.376	35.000	-4.6
V3	49.495	50.000	-1.0
V4	63.920	65.000	-1.7
V5	79.817	80.000	-0.2
V6	95.129	95.000	0.1
V7	104.805	105.000	-0.2
V8	111.800	115.000	-2.8

4.3. EVALUACIÓN DE AMOXICILINA EN EL MODELO DE CALIBRACIÓN

Una vez halladas las condiciones óptimas del modelo, a través de una adecuada selección del número de componentes principales, se obtuvo el gráfico de concentraciones observadas-predichas para amoxicilina, la cual se muestra en la figura 4.4. Las concentraciones están expresadas en mg/L.

Se observa que la gráfica de calibración se acerca a los parámetros ideales para este tipo de recta, con ordenada al origen cercana a cero (0,071991) y pendiente cercana a uno (0,998848).

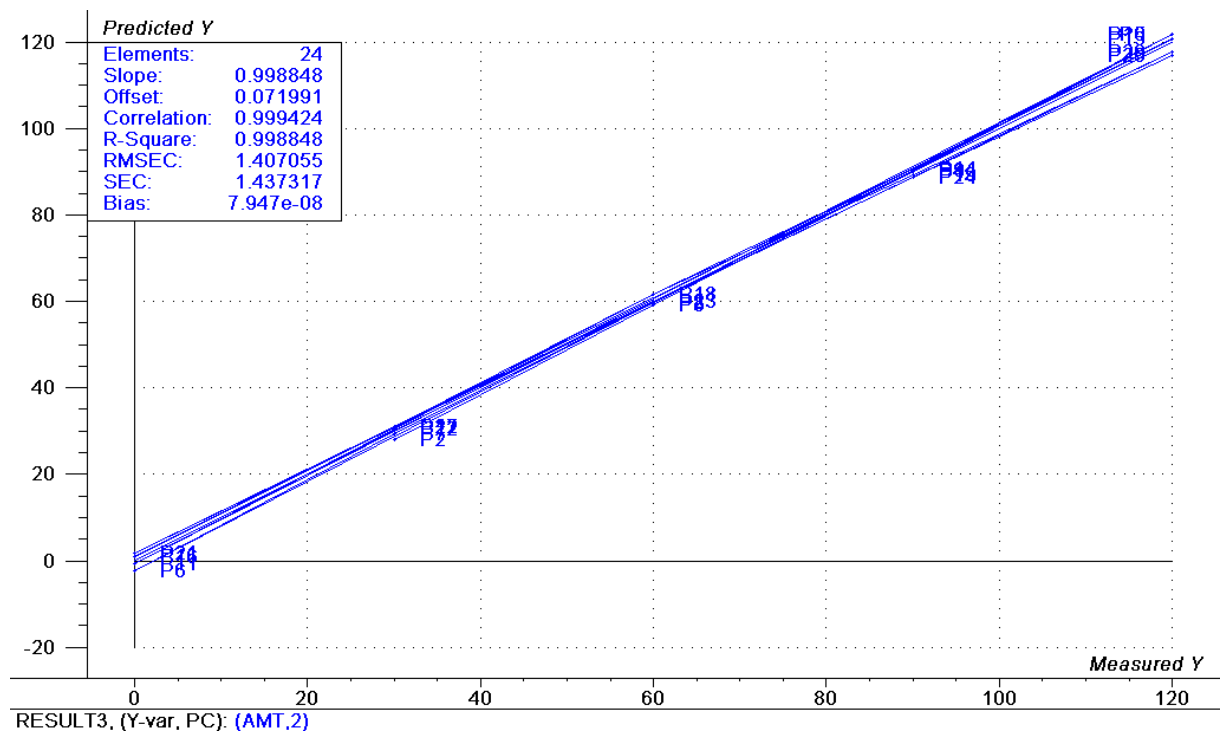


Figura 4.4. Concentración Observada- Predicha de amoxicilina (en mg L⁻¹)

4.4. CUANTIFICACIÓN DE AMOXICILINA MUESTRAS FARMACÉUTICAS COMERCIALES

En la tabla 4.3 se muestran los resultados para la cuantificación amoxicilina en las cuatro muestras farmacéuticas comerciales: amoxicilina inyectable Roemmers, Rodinac pastillas, Amixen pastillas y Glifapen pastillas, las que fueron obtenidas en farmacias locales. Se observan las concentraciones predichas por el modelo para cada una de las muestras y los valores nominales (declarados en etiqueta del producto). Los errores obtenidos fueron menores al 13 % en todos los casos.

Tabla 4.3. Concentraciones predichas en muestras comerciales de amoxicilina utilizando PLS1.

Muestras	Amoxicilina		
	PLS1 ^a	Valor nominal ^a	% Error Relativo
Roemmers	1025,1	1000	2,51
Glifapen	522,2	500	4,44
Rodinac	564,6	500	12,93
Amixen	539	500	7,80

^a Concentraciones en muestras diluidas expresados en mg por unidad (ampolla o pastilla)

Estos errores se condicen con aquellos obtenidos en la tabla 4.1. Por otra parte se debe destacar que los valores de error relativo obtenidos, son aceptables considerando el bajo costo de análisis y la versatilidad del método propuesto.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

5. 1. DEL PRETRATAMIENTO DE MUESTRA.

El método analítico presentado en el presente trabajo posee la ventaja de no requerir pretratamiento de la muestra, ya que las mismas son disueltas en condiciones normales sin pérdida de analitos, evitando el empleo de métodos separativos previos o de otro pretratamiento de la muestra. Esto es importante debido a que las muestras reales presentan excipientes, los cuales conforman una matriz de interferencias que no afecta al método analítico propuesto.

5. 2. DE LOS COSTOS INSTRUMENTALES.

En bibliografía se observa un gran número de trabajos relacionados a la determinación de amoxicilina en muestras farmacéuticas. En general, estas metodologías publicadas incluyen instrumental de muy elevado costo, lo cual lo hace poco accesible a pequeños laboratorios de control de calidad o laboratorios de bajos recursos. La metodología propuesta permite realizar análisis de control de calidad de amoxicilina en muestras farmacéuticas reales, empleando herramientas analíticas asequibles para cualquier laboratorio de bajos recursos presupuestarios.

5. 3. DE LAS VENTAJAS MULTIVARIADAS.

Los métodos actuales de análisis implican el uso de pocas variables instrumentales. Por ello resulta de interés la exploración de nuevos métodos en donde se puedan emplear un gran número de variables para el análisis simultáneo. Este es el caso de los multivariados que utilizan una gran cantidad de datos instrumentales y en el caso de esta tesis, consistieron en obtener los valores de absorbancia de espectros completos, generándose así matrices de respuestas de gran tamaño, que no serían factibles de analizar con metodologías de cálculo convencional.

5. 4. DE LA APLICABILIDAD DEL MÉTODO

Debido a su bajo costo de implementación, sumado a los errores aceptables obtenidos en comparación a los valores de referencia del fabricante, la metodología multivariada propuesta es adecuada para laboratorios de control de calidad, laboratorios de rutina y de bajos recursos presupuestarios, para la cuantificación rápida y confiable de amoxicilina en productos farmacéuticos comerciales.

CAPÍTULO 6

BIBLIOGRAFÍA

1. Mei-Chich hsu, Pei-Wen Hsu. (1992). *High-Performance Liquid Chromatographic Method for Potency Determination of Amoxicillin in Commercial Preparations and for Stability Studies*. Department of Health, Executive Yuan, National Laboratories of Foods and Drugs, Nankang, Taipei, Taiwan, Republic of China - Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology. Vol. 36, N° 6. p. 1276-1279.
2. Parisotto G., Flôres Ferrão M., Furtado J.C., Molz R.F. (2007). *Determination of amoxicillin content in powdered pharmaceutical formulations using DRIFTS and PLS*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 43, n°1, jan./mar.
3. Pasamontes A., Callao M.P. (2004). *Determination of amoxicillin in pharmaceuticals using sequential injection analysis and multivariate curve resolution*. Analytica Chimica Acta 515 p.159–165
4. Litter M. (1984). *Compendio de farmacología*. 3^{ra} ed. El Ateneo . Argentina.. pag 579-589
5. Goodman & Gilman. (1996). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9^{na} ed. MacGraww Hill. México. Pág: 974; 1099-1101; 1119; 1145; 1151 y 1155
6. Vuillemin P. (1889). *Antibiose et symbiose*. C.R. Assoc. Fr. Av. Sci., 2:525-543
7. Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M. (1999). *Pharmacology*, Churchill Livingstone, 4th Ed., London. p.690.
8. Franklin T.J., Snow G.A. (1985). *Biochemistry of Antimicrobial Action*. Chapman and Hall, 4th Ed. London. p41.
9. Silverman R.B. (1992). *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, p181. IL, USA: Academic Press, 1st Ed.
10. Alpízar Olivares Y. (2000). *La penicilina y sus derivados como agentes desencadenantes de la respuesta inmune*. Revista Cubana de Hematología, inmunología y hemoterapia. 16 (2): 99-104.

11. Lozano Valdés D., Larrondo Muguercia H., Herrera Torres M.L., Rivero Arias E., Zamora Marín R. y Araujo Praderes L.J. (1998). *Penicilinas*. Acta médica 8 (1) : 28-39.
12. Maguiña Vargas C., Ugarte Gil C.A., Montiel M. (2006). *Uso adecuado y racional de los antibióticos*. Simposio. Acta Med Per. 23 (1).
13. The University of Warwick – *Natural products as pharmaceuticals: A look at penicillin*. Third Year Poster (2001). http://homepage.ntlworld.com/diamonddove/02_Discovery/Discovery.htm. Fecha de consulta: 12/2009.
14. Iowa Government. *Penicillin*. <http://www.bestofiowa.com/dave/biochem/penicillin/penicillin.html>
Fecha de consulta: 12/2009.
15. Malgor-Valsecia. (2001). *Farmacología médica*. Editorial Universitaria de Buenos Aires. Vol 3, Capítulo 30: Antibióticos betalactámicos. Penicilinas, cefalosporinas, inhibidores de betalactamasas. Nuevos betalactámicos: Carbapenems y monobactams.
16. Queener S.F., Webber J.A., Queener, S.W. (1986) *B-lactam antibiotics for clinical use*. Clinical Pharmacology /v.4.. ISBN: 0-8247-7386-1
17. Wayne State University. Eugene Applebaum College of Pharmacy and Health Sciences. Betalactams. <http://wizard.pharm.wayne.edu/medchem/betalactam.html>
Fecha de consulta: 12/2009.
18. Stryer L.. (1995). *Biochemistry*. W.H. Freeman & Co., 4th Ed. NY, USA. P 201.
19. Carnegie Mellon University. *Penicillin: Resistance mechanism*.
<http://info.bio.cmu.edu/Courses/03441/TermPapers/2000TermPapers/group2/resi-mech.html>
Fecha de consulta: 12/2010
20. Arias C.A., Panesso D., Zúñiga M. (2003). *Guías para el uso racional de antibióticos b-lactámicos: mecanismos de resistencia y su interpretación clínica*. Biomédica, junio año/vol. 23, número 002, Instituto nacional de salud. Bogotá. Colombia. pág. 134-140.
21. Cerna Vásquez R.E. (2006). *Validación del método espectrofotométrico en infrarrojo para cuantificación de amoxicilina, cápsulas de 500 mg*. Universidad de San Carlos de Guatemala – Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Informe de Tesis.

22. García-Ruiz C., Marina M.L. (2006). *Recent advances in the analysis of antibiotics by capillary electrophoresis*. *Electrophoresis*. 27, p. 266–282
23. Wold, S. and Eriksson, L. in: H. Van der Waterbeemd Ed. (1995). “*Chemometric Method in Molecular Design*”. VCH Weinheim (Alemania).
24. Cela, R. (1994). “*Quimiometría Práctica*”. Publicaciones Universidad de Santiago de Compostela (España).
25. Mássart, D.; Vandeginste, B.; Buydens, L.; de Jong, S.; Lewy, P. and Smeyers-Verbeke, J. (1997). “*Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A and B*”. Elsevier (Alemania).
26. Camiña, J.; Ferreyra, R.; Luco, J. and E. Marchevsky. (2001). *Journal of Analytical Chemistry* 56 (1) 26.
27. Ferreyra, R.; Camiña, J.; Marchevsky, E. and J. Luco. (2000) *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 368 (6) 32.
28. Camiña, J. (1999) “*Resolución de Elementos de Tierras Raras y Otros Metales de Interés en Superconductores por la Aplicación de Métodos Quimiométricos*”. Tesis de Maestría. UNSL.
29. Preisler, J.; Jankar, L. and Sommer, M. (1993). *Collect. Czech. Chem. Commun* 58, 1495.
30. Bautista, R.; Jimenez, A.; Jimenez, F. and Arias, J. (1996). *Talanta* 43, 421.
31. Jankar, L.; Preisler, J. and Sommer, M. (1993). *Collect. Czech. Chem. Commun* 58, 1509.
32. Perutka, J.; Havel, J. and Jancar, L. (1994). *Collect. Czech. Chem. Commun* 59, 1951.
33. Navalón, A., Blanc, R.; Del Olmo, M. and Vilchez, J. (1999). *Talanta* 48, 469.
34. Ramos Martos, N.; Molina Díaz, A.; Navalón, A.; De Orbe Payá, I. and Capitán Vallbey, L. (2000). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 23, 837.
35. Coscione, A.; De Andrade, J.; Poppi, R.; Mello, C.; Van Raij, B. and Ferreira de Abreu, M. (2000). *Analytica Chimica Acta* 423, 31.
36. Kubán, V.; and Gladilovich, D. (1988) *Coll Czech. Chem. Commun*, 53, 1664.
37. Wentzell, P.; Andrews, D. and Kowalski, B. (1997) *Anal. Chem*, 69 (13), 2299.

38. Martents, H. and Naes, T. (1989). "*Multivariate Calibration*". John Wiley and Sons (Nueva York).
39. Beebe, K.; Pell, R. and Seasholtz, M. (1998). "*Chemometrics, a Practical Guide*". John Wiley and Sons (New York).
40. Beebe, K and Kowalsky, B. (1987) *Analytical Chemistry* 59 (17) 1007.
41. Kramer, R. (1998). "*Chemometric Techniques for Cuantitative Analysis*". Marcel Dekker (New York).
42. Esbensen, K.; Schönkopf, S. and Midgaard, T. (1997). "*The Unscrambler. Multivariate Analysis in Practice*". CAMO-AS (Noruega).
43. Otto, M. (1999). "*Chemometrics*". Wiley-VCH (Alemania).
44. *The Unscrambler v 6.0* by CAMO-AS, Trondheim (Noruega).
45. *The Unscrambler 6. User's Guide*. CAMO-AS, Trondheim (Noruega).
46. Meites, L. (1982) "*Handbook of analytical chemistry*". Mc Graw-Hill (New York).