



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN QUÍMICA

*“MÉTODOS ANALÍTICOS AUTOMÁTICOS PARA
EL CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS”*

Bqco. Marcos Grünhut

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2009

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Química durante el período comprendido entre el 10 de Agosto de 2004 y el 24 de febrero de 2009, bajo la dirección de Dra. Beatriz Susana Fernández Band, Profesora Titular de Química Analítica y la dirección adjunta de la Dra. Maria Eugenia Centurión, Profesora Adjunta de Química Analítica.

Bqco. Marcos Grünhut



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/....../..... , mereciendo la calificación de(.....)

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Beatriz Fernández Band mi más sincero agradecimiento por haber sido la persona que en mis primeros pasos por la Universidad me aconsejó, estimuló y más tarde hizo posible que pudiera concretar esta tesis.

A la Dra. Maria Eugenia Centurión por acompañarme, entenderme y estimularme en todo momento.

Al CONICET, por las becas otorgadas.

A Susana, Adriana, Cali, Silvana, Mariela, Mónica, Marcelo F., Marcelo T., Mariano y a todos los que pasaron por el Laboratorio y formaron parte de nuestro grupo, gracias por estar siempre.

A Naty y Caro por su amistad.

A mis compañeros del Área III, Química Analítica, por todo su apoyo.

A mi esposa Andrea por todo su apoyo y confianza.

A mis padres y mi hermana por el ánimo y por creer en mí siempre.

A todos MUCHAS GRACIAS!!

RESUMEN

La tendencia actual de los Laboratorios de Control de Calidad es la implementación de métodos analíticos versátiles, rápidos, sensibles, precisos, simples, fáciles de operar y de bajo costo. Una de las maneras más efectivas de alcanzar tales características es la automatización. En este trabajo de tesis se presenta el desarrollo de métodos analíticos automáticos basados en el Análisis por Inyección en Flujo (FIA) y la novedosa metodología Flow-Batch (FB).

En la primera parte del trabajo se realizó la cuantificación de dos catecolaminas: levodopa (LVD) y carbidopa (CBD). Las mismas se encuentran presentes en preparaciones farmacéuticas utilizadas en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. La determinación se basó en la oxidación de ambos analitos en presencia de Polifenol oxidasa. La enzima se obtuvo en el laboratorio a partir de batatas (*Ipomoea batatas*). La misma cataliza la oxidación de mono y difenoles a ortoquinonas en presencia de oxígeno. Las ortoquinonas se acoplan entre sí produciendo pigmentos melanínicos que absorben en la región del UV-visible. La superposición espectral de los productos de reacción fue resuelta mediante la aplicación de técnicas de calibración multivariada. En base a esto, se desarrollaron dos métodos:

a) Método enzimático FIA con detección espectrofotométrica para la determinación simultánea de LVD y CBD utilizando PLS. Se diseñó un sistema FIA en la modalidad flujo detenido. Se optimizaron las variables químicas y FIA

del sistema. A partir de un diseño experimental central compuesto se prepararon los conjuntos de calibración y validación teniendo en cuenta la relación LVD-CBD presente en las formulaciones farmacéuticas analizadas. Los datos espectrales obtenidos fueron analizados por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS). Los parámetros estadísticos y las figuras de mérito fueron satisfactorios para ambos analitos. Los resultados obtenidos al analizar muestras reales estuvieron en concordancia con los declarados en el rótulo del medicamento. El método se validó mediante un estudio de recuperación cuyos resultados estuvieron entre 95 y 110 % para ambos analitos. La frecuencia de muestreo fue de 22 h⁻¹.

b) Método enzimático FB con detección espectrofotométrica para la determinación simultánea de LVD y CBD utilizando PLS y MLR-SPA. Se diseñó y optimizó un sistema FB que permitió la preparación automática de los conjuntos de calibración y validación obtenidos mediante un diseño central compuesto. Los datos espectrales fueron analizados aplicando PLS y una novedosa herramienta quimiométrica: el *Algoritmo de las Proyecciones Sucesivas con Regresión Lineal Múltiple* (MLR-SPA). Los parámetros estadísticos y las figuras de mérito fueron altamente satisfactorios. El método desarrollado se aplicó a muestras reales obteniéndose resultados concordantes con los declarados en el rótulo del medicamento y los valores obtenidos por el método de referencia propuesto por la Farmacopea Norteamericana (HPLC). La frecuencia de muestreo fue de 18 h⁻¹.

En la última parte de la tesis, se trabajó en la determinación cuantitativa de dopamina, noradrenalina y adrenalina en inyectables. Estas catecolaminas son utilizadas en el tratamiento de varios trastornos clínicos como hipertensión, shock, insuficiencia cardíaca, arritmias, asma, alergia y anafilaxia. En este caso, se empleó la metodología FB con detección quimioluminiscente. La determinación de estos analitos se basó en la inhibición de la quimioluminiscencia generada en la reacción entre luminol y hexacianoferrato de potasio (III) en medio alcalino. El sistema FB propuesto permite realizar la determinación de los principios activos de manera rápida dado su alto nivel de automatización. Los testigos fueron preparados en una cámara de mezclado lo que reduce significativamente el tiempo de análisis. Se utilizó un diseño experimental Box-Behnken para la optimización de las variables químicas. El cálculo de efectos permitió determinar que las tres variables analizadas y sus interacciones fueron significativas. Los parámetros estadísticos y las figuras de mérito fueron satisfactorios. El estudio de muestras reales se realizó sobre dos marcas comerciales para cada principio activo. Los resultados fueron comparados con los declarados en el rótulo del medicamento y los obtenidos por el método de referencia (HPLC) obteniéndose, en todos los casos, óptimos resultados. Los límites de detección estuvieron en el orden de ng mL^{-1} y la frecuencia de muestreo fue de 58 h^{-1} .

ABSTRACT

Nowadays, the trends in the Laboratories of Quality Control is the implementation and development of versatile, fast, sensitive, precise, simple, easy to operate and of the low cost of analytical methods. One of the most effective ways to reach these objectives is the automatization of the analytical methods. In this thesis the development of analytical automated methods based on Flow Injection Analysis (FIA) and the new methodology Flow-Batch (FB) were proposed.

The first work was the quantification of two catecholamines: levodopa (LVD) and carbidopa (CBD). Both analytes were present in pharmaceutical preparations, which are used in the treatment of Parkinson's disease. The analytical determination was based on the enzymatic oxidation of the analytes in presence of Polyphenol oxidase (PPO). The enzyme was obtained from sweet potatoes root (*Ipomoea batatas*) in our laboratories. This enzyme catalyzes the oxidation of mono and diphenols to orthoquinones in presence of oxygen. The orthoquinones are bonded between themselves to produce melanin pigments which present a strong absorption in UV-visible zone. The spectral overlapping of the reaction products was resolved through Multivariate Calibration techniques. Two methods were proposed:

a) FIA enzymatic method with spectrophotometric detection for the simultaneous determination of LVD and CBD by using PLS. A stopped flow FIA system was developed. The chemical and FIA variables were optimized. Through and central composite experimental design the calibration and validation sets were prepared,

by taking into account the LVD/CBD ratio that are present in the pharmaceutical products. The Partial Least Square (PLS) was used for spectral data. The statistic parameters and merit figures were satisfactory for both analytes. The proposed method was validated through spiked samples and recovery study.

b) FB enzymatic method with spectrophotometric detection for the simultaneous determination of LVD and CBD by using PLS and MLR-SPA. A FB system was developed. Through and central composite experimental design the calibration and validation sets were prepared. For spectral data PLS and MLR-SPA were used. The statistic parameters and merit figures were satisfactory for both analytes. The proposed method was validated through a reference method (HPLC).

At last, an analytical method for determination of dopamine, norepinephrine and epinephrine in pharmaceutical preparations was developed. These catecholamines are used for the treatment of different clinical disorders, as heart attack, bronchial asthma and cardiac surgery. The FB technique with chemiluminescence detection was used. The analytical determination was based on the inhibition of chemiluminescence produced through the reaction of a luminol-potassium hexacyanoferrate (III) in alkaline medium. The standard solutions were prepared into the mixture cell with the purpose of reduce the time of analysis. The experimental design used was a Box Behnken for the optimization of the chemical variables. The proposed method was validated through a reference method.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal de la investigación realizada en este trabajo de tesis ha sido desarrollar e implementar métodos analíticos automáticos para la determinación de principios activos presentes en distintos medicamentos.

Este objetivo general se ha logrado con los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Obtener una enzima a partir de un producto natural, que será utilizada como un poderoso catalizador.
- ✓ Emplear las metodologías de Análisis por Inyección en Flujo (FIA) y Flow-Batch (FB) para automatizar los procesos de laboratorio.
- ✓ Procesar los datos obtenidos utilizando distintas técnicas de calibración multivariada.
- ✓ Empleo de diferentes técnicas de detección, tales como UV-visible y quimioluminiscencia.
- ✓ Obtener métodos rápidos y lo suficientemente simples como para una futura transferencia tecnológica.

INDICE GENERAL

CAPÍTULO 1	INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1	Control de Calidad de Productos Farmacéuticos	2
1.1.1	El Mercado de Medicamentos	2
1.1.2	Falsificación de Medicamentos	4
1.1.3	Control y Reglamentación Farmacéutica	6
1.1.4	Gestión de Calidad	8
1.1.5	Controles Farmacéuticos de Rutina	10
1.1.6	Técnicas y Métodos de Análisis	12
1.1.7	Validación de Métodos Analíticos	15
1.2	Automatización en Química Analítica	17
1.2.1	Calidad y Automatización	20
1.2.2	Proceso Analítico y Automatización	21
1.2.2.1	Analizadores Automáticos	24
1.2.2.1.1	<i>Análisis por Inyección en Flujo (FIA)</i>	26
1.2.2.1.2	<i>Flow-Batch (FB)</i>	33
CAPÍTULO 2	OBTENCIÓN DE POLIFENOL OXIDASA A PARTIR DE BATATAS	40
2.1	Objetivos	41
2.2	Introducción	42
2.2.1	Factores que Afectan a las Reacciones Enzimáticas	44
2.2.2	Polifenol Oxidasa (PFO)	48
2.2.2.1	Estructura y Mecanismo Catalítico de la PFO	48

2.2.2.2	Aplicaciones	51
2.3	Parte Experimental	55
2.3.1	Equipamiento	55
2.3.2	Reactivos y Soluciones	56
2.3.3	Metodología Analítica	56
2.3.3.1	Extracción de PFO a partir de Batatas	56
2.3.3.2	Actividad Enzimática en el Extracto Crudo	57
2.4	Resultados y Discusión	60
2.4.1	Obtención del Extracto Crudo	60
2.4.2	Tiempo de Conservación y Estabilidad del Extracto Crudo	62
2.5	Conclusiones Parciales	63
CAPÍTULO 3	DETERMINACIÓN DE LEVODOPA Y CARBIDOPA EN COMPRIMIDOS	64
3.1	Objetivos	65
3.2	Introducción	66
3.2.1	Calibración Multivariada	69
3.2.1.1	Cuadrados Mínimos Parciales	75
3.2.1.2	MLR con Selección de Variables	76
3.2.1.2.1	<i>Algoritmo de las Proyecciones Sucesivas (SPA)</i>	78
3.2.2	Diseño Experimental	81
PARTE A	Determinación de LVD y CBD utilizando un Sistema FIA y PLS-1	84
3.3	Parte Experimental	85
3.3.1	Equipamiento y Programas Quimiométricos	85
3.3.2	Reactivos y Soluciones	85

3.3.3	Metodología Analítica	86
3.3.3.1	Preparación de los Conjuntos de Calibración y Validación	86
3.3.3.2	Preparación de las Muestras	87
3.3.3.3	Sistema FIA y Procedimiento Desarrollado	88
3.4	Resultados y Discusión	90
3.4.1	Optimización de Variables Químicas y Parámetros FIA	90
3.4.2	Selección de Variables Espectrales	91
3.4.3	Optimización del Tiempo de Reacción	93
3.4.4	Estudio de Interferentes	94
3.4.5	Parámetros Analíticos	94
3.4.5.1	Aplicación de PLS-1	94
3.4.5.2	Aplicación a Muestras Reales y Estudio de Recuperación	97
3.5	Conclusiones Parciales	100
PARTE B	Determinación de LVD y CBD utilizando un Sistema FB y MLR-SPA	102
3.6	Parte Experimental	103
3.6.1	Equipamiento y Programas Quimiométricos	103
3.6.2	Reactivos y Soluciones	103
3.6.3	Metodología Analítica	104
3.6.3.1	Preparación de los Conjuntos de Calibración y Validación	104
3.6.3.2	Preparación de las Muestras	105
3.6.3.3	Sistema FB	105
3.6.3.4	Procedimiento Desarrollado	108
3.7	Resultados y Discusión	112
3.7.1	Optimización de Variables Químicas y Parámetros FB	112
3.7.2	Selección de Regiones Espectrales	113

3.7.3	Optimización del Tiempo de Reacción	114
3.7.4	Parámetros Analíticos	115
3.7.4.1	Regresión Lineal Univariada (ULR)	115
3.7.4.2	PLS-1 y MLR-SPA	115
3.7.4.2.1	<i>PLS-1</i>	115
3.7.4.2.2	<i>MLR-SPA</i>	116
3.7.4.3	Estudio Comparativo de los Modelos Quimiométricos	118
3.7.4.4	Aplicación a Muestras Reales	119
3.8	Conclusiones Parciales	123
3.9	Conclusiones del Capítulo	125
CAPÍTULO 4	DETERMINACIÓN DE CATECOLAMINAS EN INYECTABLES	127
4.1	Objetivos	128
4.2	Introducción	129
4.2.1	Quimioluminiscencia (CL)	132
4.2.1.1	Fundamento y Mecanismo de la CL	133
4.2.1.2	Instrumentación	137
4.2.1.3	Factores que Influyen en la Emisión en CL	139
4.2.2	Diseño Experimental Box-Behnken	141
4.3	Parte Experimental	142
4.3.1	Equipamiento y Programas Quimiométricos	142
4.3.2	Reactivos y Soluciones	142
4.3.3	Metodología Analítica	143
4.3.3.1	Sistema FB	143

4.3.3.2	Procedimiento Desarrollado	146
4.3.3.3	Preparación de las Muestras	149
4.4	Resultados y Discusión	150
4.4.1	Optimización de Parámetros FB	150
4.4.2	Optimización de las Variables Químicas	151
4.4.3	Parámetros Analíticos	156
4.4.4	Estudio de Interferentes	156
4.4.5	Aplicación a Muestras Reales	157
4.5	Conclusiones Parciales	162
CAPÍTULO 5	CONCLUSIONES GENERALES	163
APÉNDICE	PRODUCTIVIDAD DE LA TESIS	167

ABREVIATURAS

A

A: Agua

Ae: Accionador electrónico

AE: Actividad Enzimática

AM: Agitador Magnético

ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

ANOVA: Análisis de la Varianza

Ap: Apoenzima

B

BP: Bomba Peristáltica

C

CBD: Carbidopa

CL: Quimioluminiscencia

CLS: Mínimos Cuadrados Inversos

CM: Cámara de Mezclado

Co: Cofactor

CV: Validación Cruzada

D

D: Desecho

DBB: Diseño Experimental Box-Behnken

DCC: Diseño Experimental Central Compuesto

DOP: Dopamina

E

EFQM: European Foundation for Quality Management

EJCR: Región Elíptica de Confianza Conjunta

EPI: Epinefrina

F

F: Fluoróforo

FB: Flow-Batch

FIA: Análisis por Inyección en Flujo

G

GC: Cromatografía Gaseosa

GL: Grados de Libertad

GLP: Good Laboratory Practices

GMP: Good Manufacturing Practices

H

HE: Hexacianoferrato de Potasio (III)

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Presión

I

I: Inyección

ILS: Mínimos Cuadrados Inversos

INDEC: Instituto Nacional de Estadísticas y Censos

ISO: International Organization for Standardization

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

L

LAQA: Laboratorio de Quimiometría y Automatización

LOD: Límite de Detección

LU: Luminol

LVD: Levodopa

M

M: Muestra

MLR: Regresión Lineal Múltiple

MS: Media Cuadrática

MS_{lof}: Media Cuadrática de la Falta de Ajuste

MS_{pe}: Media Cuadrática del Error Puro

MS_R: Media Cuadrática de la Regresión

MS_r: Media Cuadrática de los Residuos

N

NIR: Infrarrojo Cercano

NOR: Norepinefrina

O

O: Oxidante

P

P: Predicción

P: Producto

PC: Computadora

PCR: Regresión por Componentes Principales

PFO: Polifenol oxidasa

PLS: Mínimos Cuadrados Parciales

Q

q: Caudal

R

R²: Cuadrado del Coeficiente de Correlación

RE: Error Relativo

REP: Error Relativo de Predicción

RMSE: Raíz Cuadrada del Error Cuadrático Medio

RMSEP: Error Medio de Predicción

RMSEP: Raíz Cuadrada del Error Cuadrático Medio de Predicción

RSD: Desviación Estándar Relativa

S

S: Sustrato

SD: Desviación Estándar

SEN: Sensibilidad

SL: Solución de Lavado

SPA: Algoritmo de las Proyecciones Sucesivas

SR: Solución Reguladora

SS: Suma de Cuadrados

U

UE: Unidades de Enzima

ULR: Regresión Lineal Univariada

USP: United States Pharmacopoeia

V

VI: Válvula de Inyección

Capítulo 1



INTRODUCCIÓN

GENERAL

1.1 CONTROL DE CALIDAD EN PRODUCTOS FARMACÉUTICOS

1.2 AUTOMATIZACIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA

El análisis y control de medicamentos es una actividad fundamental para conseguir y garantizar la calidad de los mismos. A tales fines, es un constante desafío, tanto de los laboratorios farmacéuticos como de los que ejercen el respectivo control, la implementación de métodos rápidos, sencillos y confiables para el monitoreo de las distintas etapas que comprende la producción de un medicamento, desde la recepción de la materia prima hasta que el mismo se encuentre listo para el expendio y consumo.

1.1.1 El Mercado de Medicamentos

La importancia económica y financiera del mercado de medicamentos es enorme. En el año 2007 se registraron en todo el mundo ventas superiores a los US\$ 663.000 millones (Tabla 1.1). El consumo mundial crece a una tasa sostenida del 6 a 8 % anual desde hace varios años. Sin embargo, el crecimiento es mayor en los países desarrollados, concentrándose cada vez más en los sectores de mayor poder adquisitivo. Además, se observa un consumo que no se relaciona con necesidades sanitarias sino con las posibilidades económicas. Un importante grupo de población es considerado consumidor masivo y otros ni siquiera tienen acceso a medicamentos esenciales.

En varios países latinoamericanos, los gastos anuales en medicamentos equivalen a más de un 20 % de todos los gastos realizados por el sector público, por los agentes privados y por las familias. En Argentina, se estima que el gasto en medicamentos constituye alrededor del 50 % del gasto en salud de los hogares. Por otro lado, el 20% más pobre de la población destina aproximadamente el 70 % de su gasto en salud a la compra de medicamentos, mientras que para el 20 % más rico de la población, los medicamentos representan poco más de un 30 % de su gasto en salud.

Tabla 1.1. Ventas y crecimiento del mercado de medicamentos durante 2007.

MERCADO AÑO 2007	VENTAS		CRECIMIENTO ^a
	Miles de Millones de US\$	% del Global	%
Norteamérica	304,5	45,9	4,2
Europa	206,2	31,1	6,7
Asia, África y Australia	62,2	9,4	13,1
Japón	58,5	8,8	4,2
Latinoamérica	32,0	4,8	12,0
Mundial	663,5	100	6,1

^a Crecimiento respecto del año 2006. Fuente: ISM Health. www.ismhealth.com

En el primer trimestre de 2008, la facturación total de la Industria Farmacéutica Argentina fue superior a los \$ 2067 millones, registrando un aumento del 16,8 % respecto a igual período del año 2007. En la [Figura 1.1](#) se presentan datos de las ventas correspondientes al primer trimestre de los años 2004 a 2008. En todos los períodos analizados, los medicamentos de mayor facturación fueron los destinados

al Sistema Nervioso (\$ 328 millones). La información se obtuvo directamente de las 75 empresas que constituyen el núcleo de la industria farmacéutica nacional [1].

El medicamento es un elemento fundamental de la calidad del procedimiento terapéutico, por eso representa, aún con todas las distorsiones del mercado, el medio más eficaz para conseguir un elevado impacto en la equidad.

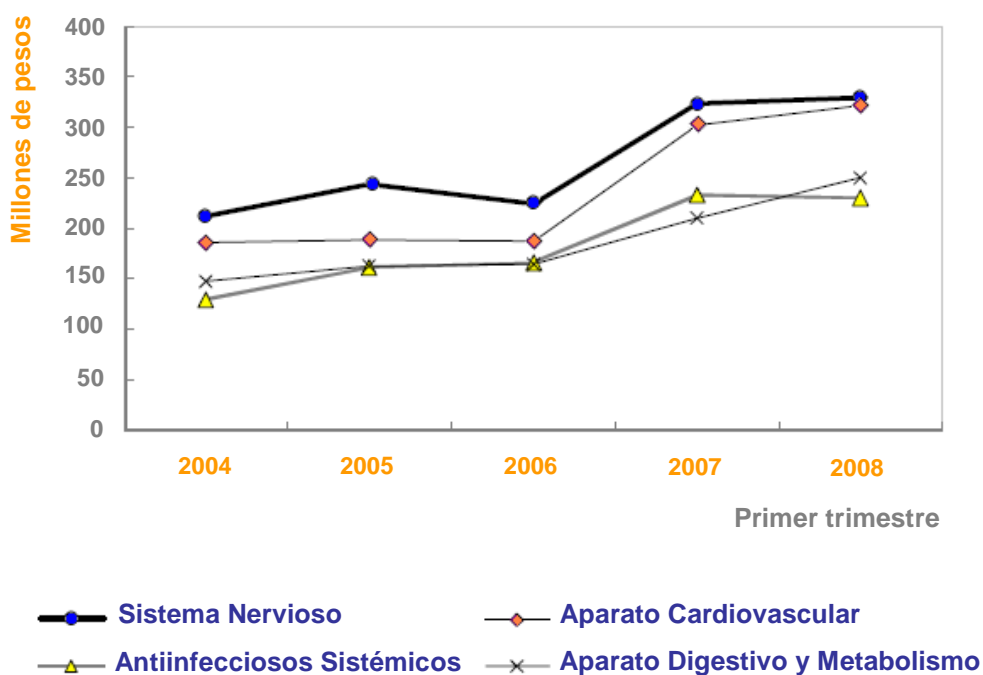


Figura 1.1. Medicamentos de mayor facturación en Argentina. Período de evaluación: primer trimestre de 2004 a 2008. Adaptado de [1].

1.1.2 Falsificación de Medicamentos

En algunos países es frecuente la fabricación, la distribución ilegal (incluidas las

[1] Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INDEC), Industria Farmacéutica, Buenos Aires, 2008. Página oficial INDEC: www.indec.gov.ar

ventas callejeras y en mercados) y el contrabando de medicamentos. En muchos casos, laboratorios que no cumplen con las prácticas adecuadas de fabricación producen medicamentos de consumo interno y para exportación. Un problema importante es que los medicamentos se comercializan a través de varios intermediarios y en zonas de libre comercio. En ocasiones se envasan y etiquetan de nuevo para ocultar su verdadero origen o identidad. Aunque es difícil obtener cifras precisas, se calcula que los medicamentos falsificados representan más del 10 % del mercado farmacéutico mundial. Si bien esta práctica existe en todas las regiones, los países en desarrollo son los más perjudicados, pues se estima que el 25 % de los medicamentos que se consumen en ellos han sido falsificados.

Se prevé que en 2010 el valor total de las ventas de medicamentos falsificados a nivel mundial ascenderá a US\$ 75.000 millones, lo que representa un incremento de más del 90 % con respecto a 2005. En Argentina, el mercado ilegal de medicamentos mueve alrededor de \$ 1.100 millones por año.

El comercio de estos productos es más generalizado en países donde el control y la aplicación de la reglamentación farmacéutica son deficientes, la oferta de medicamentos esenciales es escasa o irregular, los mercados no están reglamentados y los precios no son accesibles. No obstante, a medida que se perfeccionan los métodos de falsificación, aumenta la presencia de tales productos incluso en mercados que cuentan con controles más estrictos.

El uso de medicamentos ineficaces, nocivos o de mala calidad puede traer consigo fracasos terapéuticos, agravamiento de las enfermedades,

farmacorresistencias y, en ocasiones, la muerte de los pacientes. Además, disminuye la confianza en los sistemas sanitarios y en los profesionales de la salud, como también en los fabricantes y distribuidores de productos farmacéuticos. El dinero gastado en medicamentos ineficaces o de mala calidad es dinero desperdiciado, ya sea por los consumidores o por las administraciones públicas. Éstas deben crear organismos sólidos que reglamenten eficazmente la fabricación, el comercio y el uso de los medicamentos a fin de proteger y promover la salud pública [2].

1.1.3 Control y Reglamentación Farmacéutica

En la actualidad, alrededor del 20 % de los países disponen de una reglamentación farmacéutica bien desarrollada y operativa. Del 80 % restante, aproximadamente la mitad cuenta con reglamentaciones de capacidad y grado de desarrollo diversos, y en el resto no existen o son muy limitadas. La realidad es que muchos países de bajos ingresos no pueden garantizar la seguridad, la eficacia y la calidad de los medicamentos que circulan en sus mercados. Los problemas de una reglamentación ineficaz traspasan las fronteras nacionales y tienen consecuencias a nivel mundial.

Los primeros intentos para la reglamentación y control de las drogas y medicamentos en nuestro país se remontan al 9 de abril de 1822. En esa fecha

[2] Organización Mundial de la Salud (OMS), *Perspectivas Políticas de la OMS sobre Medicamentos*, Ginebra, 2003.

Bernardino Rivadavia, mediante un decreto, reglamentó el ejercicio de la Medicina y la Farmacia, y estableció que “... *la elaboración de las medicinas en las boticas será en todo arreglada a la farmacopea Española cuarta edición*”. No fue hasta 1892 que, por proposición del entonces Presidente del Departamento Nacional de Higiene Dr. José Ramos Mejía, se nombró la primera Comisión Redactora de la Farmacopea Nacional Argentina. Finalmente el 1 de diciembre de 1893, en consideración al texto original presentado por esta comisión, el Honorable Congreso de la Nación declaró a esta obra como *Codex Medicamentarius de la República Argentina*, obligatorio para todas las farmacias establecidas en el territorio de la Nación [3].

En 1996 el Ministerio de Salud de la Nación encomendó a la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) la integración y reactivación del funcionamiento de la Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina, la que tendría su sede en dicho organismo. La ANMAT es un organismo destinado a colaborar en la protección de la salud humana, asegurando la calidad de productos de su competencia: medicamentos, alimentos, productos de uso doméstico, médico y de diagnóstico [4].

La *Farmacopea* o *Codex Medicamentarius* es una obra que comprende, por una parte, los métodos generales de análisis, descripciones de reactivos, etc. y por otra, monografías en las cuales se describen los tipos de drogas más usuales y las distintas preparaciones y medicamentos de utilidad para la medicina y la farmacia. Estas monografías tratan aspectos como origen, nomenclatura, características

[3] Farmacopea Argentina, Ministerio de Salud, ANMAT, Buenos Aires, 2003.

[4] Página oficial ANMAT: www.anmat.gov.ar

físicas y químicas, preparación, identificación, pureza, cuantificación, dosis, conservación y demás condiciones que aseguren la calidad y uniformidad de sus propiedades. Los métodos que en ella se describen se utilizan como referencia en caso de litigio relacionado con la calidad del producto.

1.1.4 Gestión de Calidad

Según la norma ISO 9000 *“Calidad es la capacidad de un conjunto de características intrínsecas para satisfacer requisitos”* [5]. Debido a la importancia que ha cobrado la calidad en los sectores industrial y de servicios, se han desarrollado una serie de herramientas para tratar lo relacionado con la calidad. La Gestión de Calidad, entendida como el conjunto de actividades dirigidas a fijar objetivos y responsabilidades, y asegurar que éstos se cumplan mediante un plan estratégico, se ha convertido en una parte muy importante de la gestión general de cualquier organización. La aparición de numerosos estándares de calidad como por ejemplo, normas ISO (International Organization for Standardization), EFQM (European Foundation for Quality Management), GMP (Good Manufacturing Practices) y GLP (Good Laboratory Practices), normas de cumplimiento obligatorio, bien por normativa o bien por imposiciones del mercado, hacen necesario que toda empresa “certificada” de acuerdo a normativas de calidad, deba disponer de un Departamento de Calidad. Dicho departamento es el responsable de hacer cumplir

[5] International Organization for Standardization (ISO), Norma ISO 9000, 2000. Página oficial ISO: www.iso.org

la Política de Calidad de la empresa, llevando a cabo todas las acciones o bien delegando en otros departamentos parte de sus responsabilidades.

Un elemento muy importante en la Gestión de Calidad de una empresa es el Control de Calidad ya que es la herramienta que permite asegurar que los productos fabricados cumplen una serie de requisitos que los definen como “de calidad”. El Control de Calidad puede ser definido como la *“Combinación de sistemas, procedimientos, instrucciones y actividades realizadas para controlar y mantener un trabajo de calidad”*. En términos prácticos, el Control de Calidad consiste en realizar mediciones de parámetros del producto, determinando si los valores obtenidos están en concordancia con las especificaciones preestablecidas. Generalmente, dicho control es aplicado a las materias primas, productos intermedios o finales utilizados o generados por una empresa.

De acuerdo a esto, la calidad es un parámetro por demás importante en todos los sectores industriales. Si nos referimos específicamente a la Industria Farmacéutica, la calidad ocupa un protagonismo esencial debido a la naturaleza y finalidad de los productos generados. La calidad de un producto farmacéutico puede atribuirse al cumplimiento de dos condiciones básicas:

- ✓ Que el producto farmacéutico en cuestión sea efectivo en el tratamiento de una determinada patología.
- ✓ Que no provoque efectos perjudiciales o no deseados, es decir que sea seguro para la salud.

Por otro lado, debe tenerse en cuenta que el Control de Calidad de Medicamentos no solo abarca a la industria farmacéutica. La preparación magistral y la fabricación en el nivel hospitalario también deben someterse a un estricto control. En todos los casos, el establecimiento de un sistema de Gestión de Calidad compete a las tres principales áreas de la actividad farmacéutica que son la distribución, la fabricación y la función de laboratorio. En este sentido, el Análisis de Laboratorio es una contribución esencial en el Control de Calidad de Medicamentos.

1.1.5 Controles Farmacéuticos de Rutina

Los análisis que se realizan como parte del Control de Calidad en una empresa farmacéutica son numerosos y variados. Esto se debe fundamentalmente al número y diversidad de productos que se analizan, y a las exigencias particulares de cada producto. Por otro lado, algunas pruebas son específicas para un determinado tipo de producto, mientras que otras son más generales y se realizan para casi todos. Dentro de los ensayos más generales se pueden mencionar:

- ✓ *Aspecto.* Se trata de realizar una descripción cualitativa, tanto si es materia prima como producto intermedio o acabado. Se comprueban distintas características como pueden ser: apariencia (sólido, líquido, suspensión, etc.), color, forma, tamaño, etc.
- ✓ *Identificación.* Los ensayos de identificación deben establecer la identidad del producto analizado y ser capaces de discriminar entre compuestos parecidos o de estructura relacionada que pueden formar parte de la muestra. Este ensayo

debe ser lo más específico posible. La falta de especificidad de un método de identificación puede ser solucionada mediante combinación de varios métodos.

✓ *Ensayo de Contenido.* Consiste en una determinación cuantitativa del producto, para establecer su grado de pureza o bien para determinar el contenido de uno o más componentes de la muestra. Una vez realizada la determinación se comprueba si los valores obtenidos se corresponden con las especificaciones del producto.

✓ *Sustancias Relacionadas.* Esta denominación involucra las posibles impurezas que pueda contener una muestra. Las mismas pueden ser de origen orgánico o inorgánico, y derivadas tanto de la degradación de alguno de los componentes de la muestra como del proceso de producción, como es el caso de los disolventes residuales. Se debe disponer de métodos lo suficientemente sensibles para poder determinar los bajos niveles de concentración de este tipo de sustancias.

✓ *Propiedades Físicoquímicas.* Las propiedades a determinar varían en función de la naturaleza del producto. De esta forma, en preparados líquidos, como bebibles o inyectables, se suelen realizar controles de pH, fuerza iónica, etc. mientras que para los productos sólidos se realizan ensayos de tamaño de partícula (granulometrías), control de dureza, etc.

✓ *Ensayo de Disolución.* Es una medida que indica cómo el principio activo es liberado del producto farmacéutico. Es una prueba muy importante en Control de Calidad de preparados sólidos, ya que da una aproximación del comportamiento

del medicamento en el cuerpo una vez consumido. Suele realizarse para comprimidos, sobres e incluso para parches cutáneos.

✓ *Ensayo de Uniformidad de Contenido.* Es una medida de la homogeneidad del producto. También se la puede denominar homogeneidad de lote, puesto que se comprueba que distintas partes de un mismo lote contengan la misma dosis de principio activo.

✓ *Ensayos Biológicos.* Este tipo de ensayos suele llevarse a cabo utilizando microorganismos. Se aplica a muestras líquidas, en el caso de querer evaluar su esterilidad o carga microbiana, o bien para antibióticos y vacunas para determinar su efectividad, denominada potencia. Son muy diversos y en general suelen ser específicos para cada tipo de producto analizado.

En este trabajo de tesis se proponen una serie de métodos para la determinación cuantitativa del/los componente/s presente/s en diferentes muestras de medicamentos (*Ensayo de Contenido*).

1.1.6 Técnicas y Métodos de Análisis

La identificación y la determinación cuantitativa de principios activos requieren procedimientos analíticos muy diversos cuya elección no siempre es fácil. Por lo tanto, es necesario, antes de establecer o adaptar un método analítico más o menos complejo y demandante en tiempo y material, plantear muy bien el problema a resolver. El método analítico a utilizar será función de:

- ✓ *La Composición del Medio.* En una formulación farmacéutica, el/los principio/s activo/s coexiste/n con excipientes y conservadores.
- ✓ *Las Características de los Métodos Analíticos.* Algunos métodos son más o menos sensibles y selectivos.
- ✓ *Las Características de la Molécula.* Las características fisicoquímicas como el punto de fusión, la actividad óptica, los espectros de absorción en la región UV-visible, IR u otra, pueden ayudar a identificar una molécula. El carácter ácido-base, la volatilidad, solubilidad, estabilidad, polaridad, etc., pueden contribuir a la separación y la determinación cuantitativa de la molécula de interés.

Todos estos criterios deben facilitar la selección de la técnica que se adapte mejor a las necesidades ^[6].

La mayoría de los controles de rutina suelen llevarse a cabo mediante técnicas instrumentales de análisis. La tendencia actual de las Farmacopeas y los Laboratorios de Control de Calidad es introducir cada vez más este tipo de técnicas en sustitución de los métodos tradicionales que, en general, resultan más laboriosos y demandan mayor cantidad de tiempo. En la [Tabla 1.2](#) se muestran algunas de las técnicas habituales junto con sus aplicaciones en el control de calidad farmacéutico.

Sin embargo, la utilización de nuevas técnicas analíticas, así como la conjunción de técnicas instrumentales con técnicas quimiométricas, resulta conveniente para resolver los problemas o limitaciones que presentan las técnicas habituales. Estas

^[6] D. Pradeu, *Análisis Químicos Farmacéuticos de Medicamentos*, Noriega Editores, México, 1998.

alternativas están ganando aceptación en la Industria Farmacéutica y se están introduciendo cada vez más en los Laboratorios de Control de Calidad.

En este trabajo de tesis se propone, por un lado, la utilización de la *Espectrofotometría UV-visible* asistida con técnicas de *Calibración Multivariada*, y por otro, la aplicación de técnicas luminiscentes, en particular *Quimioluminiscencia*, para la resolución de problemas de análisis cuantitativo en productos farmacéuticos.

Tabla 1.2. Técnicas habituales en el Control de Calidad de Productos Farmacéuticos.

TÉCNICA	APLICACIONES
Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC)	<ul style="list-style-type: none"> - Ensayos de Contenido - Caracterización de Impurezas ^a - Determinación de Impurezas - Ensayos de Estabilidad
Cromatografía Gaseosa (GC)	<ul style="list-style-type: none"> - Ensayos de Contenido - Caracterización de Impurezas ^a - Determinación de Impurezas - Determinación de Disolventes Residuales ^b
Espectrofotometría UV-visible	<ul style="list-style-type: none"> - Ensayo de Contenido - Test de Disolución
Espectrofotometría IR	<ul style="list-style-type: none"> - Test de Identificación de Materias Primas
Espectrofotometría de Absorción/Emisión Atómica de Llama	<ul style="list-style-type: none"> - Ensayo de Contenido de Metales - Determinación de Impurezas Metálicas
Polarímetro	<ul style="list-style-type: none"> - Determinación de Pureza Óptica - Determinación de Excesos Enantioméricos

^a Acoplado a Espectrometría de Masas.

^b Modalidad Head Space.

La posible aplicación de estas técnicas al control de calidad farmacéutico representa una gran ventaja ya que las mismas presentan un gran potencial analítico, una gran versatilidad, y el costo de los instrumentos, el consumo de reactivos y el tiempo de análisis suelen ser menores comparados con la mayoría de las técnicas habitualmente utilizadas.

1.1.7 Validación de Métodos Analíticos

La validación de un método de ensayo tiene como finalidad demostrar la idoneidad de dicho método para llevar a cabo un análisis determinado. Mediante la validación del método se establece si los parámetros de calidad satisfacen los requisitos de una aplicación analítica concreta. Para ello, se requiere experimentación y comparación con valores de referencia bien conocidos. Los objetivos de una validación analítica son:

- ✓ Garantizar la coherencia entre los resultados obtenidos y las necesidades.
- ✓ Asegurar la calidad y constancia de la calidad de la información obtenida.
- ✓ Caracterizar métodos y herramientas analíticas.
- ✓ Facilitar las auditorías de calidad.
- ✓ Fundamentar la transferencia (de métodos y herramientas) y la armonización de los resultados entre los laboratorios, con el objetivo de conseguir el reconocimiento mutuo entre laboratorios.

Los métodos propuestos en el presente trabajo de tesis fueron validados a través

del cálculo de parámetros estadísticos, estudios de recuperación y métodos de referencia citados en distintas farmacopeas internacionales ^[7] ^[8].

^[7] United States Pharmacopoeia 29, The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2005.

^[8] British Pharmacopoeia, The Stationery Office Ltd., Norwich, 1998.

1.2 AUTOMATIZACIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA

Desde un punto de vista intrínseco, la finalidad de la Química Analítica es alcanzar la calidad metrológica. Esto significa, asegurar un alto nivel de exactitud en los resultados obtenidos, para el nivel de incertidumbre deseado. Sin embargo, el cumplimiento de esto implica una disminución en las propiedades complementarias, como lo son la rapidez, el bajo costo y los factores personales. Por lo tanto, el compromiso entre ellas obliga a definir la calidad metrológica como la deseada o suficiente para el usuario. Por otra parte, la finalidad extrínseca principal de la Química Analítica es resolver problemas analíticos generados por problemas económico-sociales o científico-técnicos. Ambas finalidades no son independientes, sino que están relacionados entre sí. De forma general, pueden definirse los objetivos de la Química Analítica como la obtención de la mayor cantidad de información química posible y de la mejor calidad utilizando cada vez menos material, tiempo, esfuerzo, costos y riesgos para el operador y el medio ambiente (Figura 1.2) ^[9].

De esta manera, tanto la sociedad como los laboratorios de rutina demandan la presencia de métodos que se caractericen por:

- ✓ Ser rápidos, permitiendo el análisis de un gran número de muestras.

^[9] M. Valcárcel, M.S. Cárdenas, *Automatización y Miniaturización en Química Analítica*, Springer, Barcelona, 2000.

- ✓ Ser automáticos, requiriendo ninguna o una mínima participación humana.
- ✓ Requerir volúmenes pequeños, tanto de reactivos como de muestra.
- ✓ Ser simples, puesto que la simplicidad es una de las tendencias más importantes de la Química Analítica.
- ✓ Permitir efectuar medidas in-situ.



Figura 1.2. Finalidades y objetivos de la Química Analítica. Adaptado de ^[9].

Una de las maneras más efectivas de alcanzar las características antes mencionadas es la *Automatización*. De forma general, la automatización implica la sustitución parcial o completa de la participación humana en una operación o secuencia de operaciones. Esta participación puede concretarse en el esfuerzo, los

sentidos y la inteligencia. Por eso, en un sentido más amplio, la IUPAC (Internacional Union of Pure and Applied Chemistry) define a la automatización como *“el empleo combinado de dispositivos, aparatos e instrumentos para sustituir, mejorar, ampliar o suplementar el esfuerzo, los sentidos y la inteligencia humana en el desarrollo de un proceso. El sistema puede incluir un elemento de decisión no humano, denominado de retroalimentación (feed-back) para controlar algunas de sus operaciones mas relevantes”*.

A partir de esta definición podemos establecer una clara diferencia entre dos sistemas: *Sistemas Automáticos* y *Sistemas Automatizados*. Los *Sistemas Automáticos* son aquellos que originan acciones previamente programadas por un operador, para ser llevadas a cabo en momentos determinados del proceso sin la intervención humana. En este caso, el sistema no toma decisiones por sí mismo, siguiendo siempre la misma secuencia de operación. Los *Sistemas Automatizados* son sistemas automáticos que tienen incorporado un elemento de retroalimentación que toma decisiones en determinados momentos de la operación sin la intervención humana. Estos sistemas se autocontrolan y autoajustan, pudiendo la secuencia de operaciones ser diferente según la ocasión [9].

Los objetivos de la automatización en Química Analítica deben ser coherentes, por una parte, con sus fines y objetivos, y por otra, con las ventajas estratégicas generales que implica la sustitución de la participación humana en los procesos de una organización. En la [Figura 1.3](#) se esquematizan los objetivos que persigue la Automatización en Química Analítica.



Figura 1.3. Objetivos que persigue la sustitución de la intervención humana en Química Analítica y aspectos genéricos con los que están relacionados. Adaptado de [9].

1.2.1 Calidad y Automatización

Existen dos conceptos generales de Calidad en relación con la Química Analítica: *Calidad Externa* y *Calidad Interna*. La *Calidad Externa* es la que se asocia y caracteriza a los productos, sistemas o servicios del organismo solicitante de la información química. Por otro lado, la *Calidad Interna* o *Calidad Analítica* está representada por tres componentes fundamentales íntimamente relacionados entre sí:

- ✓ Calidad de la información generada, que incluye calidad metrológica y calidad

aplicada.

- ✓ Calidad de las herramientas y procesos analíticos diseñados para generar información química.
- ✓ Calidad del trabajo y organización de laboratorio.

La calidad analítica debe soportar a la calidad externa de la misma. La monitorización de productos, como por ejemplo los farmacéuticos, o de sistemas, como por ejemplo los industriales, mediante sistemas automáticos o automatizados, implica una mejora en la coherencia entre la información requerida y la generada en el contexto del problema analítico.

Por otro lado, algunos de los inconvenientes de sustituir la participación humana en las herramientas y procesos analíticos pueden minimizarse o eliminarse con la aplicación sistemática de sistemas de Gestión de Calidad. Los mismos se basan en actividades coordinadas de control y evaluación bajo diferentes marcos normativos (ver sección 1.1.4). Los sistemas de Gestión de Calidad son altamente recomendables cuando se incrementa la sustitución de la participación humana.

1.2.2 Proceso Analítico y Automatización

El *Proceso Analítico* puede dividirse en tres etapas:

- ✓ *Operaciones Previas*. Están divididas por un gran número de subetapas: muestreo, homogeneización, secado, triturado, conservación, disgregación, destrucción de la materia orgánica, técnicas de separación, reacciones

(analíticas y no analíticas), entre otras. El número y orden en que se lleven a cabo dependerá del problema analítico planteado (el o los analitos a determinar, la matriz de la muestra, el estado de agregación de la muestra, etc.). Son las responsables de la mayoría de los errores tanto aleatorios como sistemáticos, lo que hace que sea la etapa del proceso analítico que más afecta la calidad de los resultados. Llevar a cabo la automatización, parcial o total, del tratamiento de las muestras contribuye ampliamente a mejorar las propiedades analíticas supremas (representatividad y exactitud) y básicas (precisión) debido fundamentalmente a la reducción de los errores introducidos por la participación humana.

✓ *Medida de la Señal Analítica.* Para esto, se utiliza un instrumento que brinda información primaria sobre la presencia (análisis cualitativo), concentración (análisis cuantitativo) o estructura (análisis estructural) de un compuesto en una muestra. Estos datos primarios son posteriormente transformados en información analítica mediante el empleo de herramientas quimiométricas adecuadas, de manera de poder ser utilizados para resolver el problema planteado.

✓ *Adquisición y Tratamiento de Datos.* Podemos afirmar que ésta es la etapa más automatizada debido al aporte de la informática y al desarrollo de nuevas interfases.

El grado de sustitución de la participación humana en las distintas etapas del proceso analítico es desigual en cada caso. Por otro lado, cada vez es menos

marcada la separación entre la segunda y tercera etapa. Esto se debe, fundamentalmente, al crecimiento de la microelectrónica y la microinformática, las cuales han permitido el diseño de distintas interfases para la comunicación entre instrumentos y computadoras. En la [Figura 1.4](#) se puede observar como se relaciona un instrumento y una computadora personal.

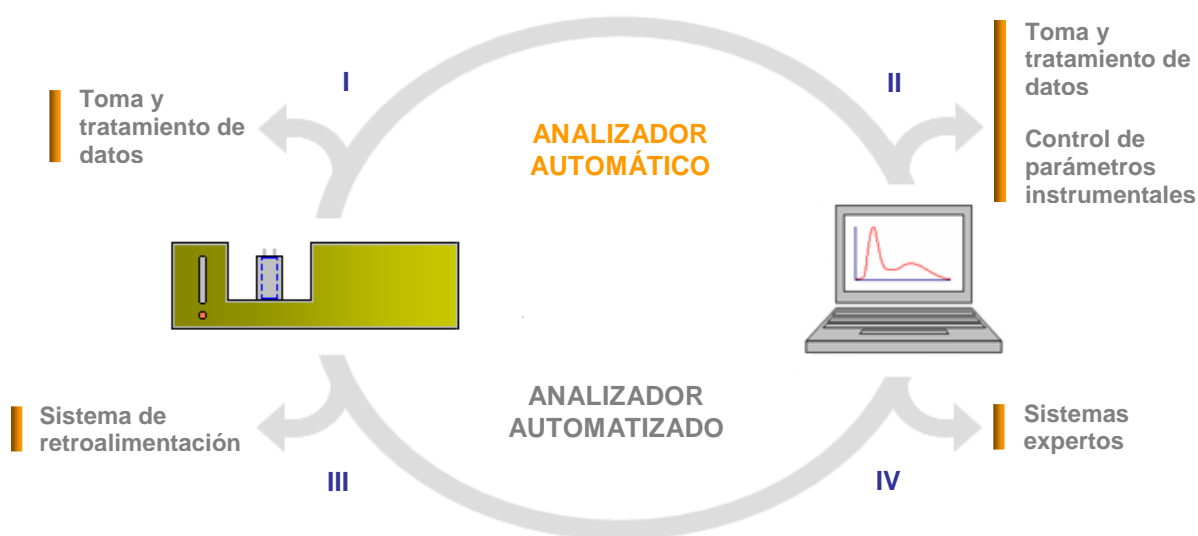


Figura 1.4. Relación entre un instrumento y una computadora personal. Adaptado de [9].

- I. La computadora personal actúa de forma separada (fuera de línea) para el tratamiento de los datos.
- II. Mediante una conexión en línea vía interfase pasiva, para la toma y tratamiento de datos y el control de parámetros instrumentales.
- III. Por medio de una interfase activa que permite el control de parámetros instrumentales, modificando su funcionamiento, dependiendo del tipo de muestra

que se esté analizando, a través de uno o varios sistemas de retroalimentación.

IV. La computadora proporciona “inteligencia” al instrumento analítico y se consigue así el mayor grado de automatización.

1.2.2.1 Analizadores Automáticos

Un analizador puede definirse como una serie de elementos, de los cuales uno como mínimo es un instrumento, que opera con diferentes grados de automatización y ha sido diseñado para la determinación cualitativa o cuantitativa de uno o varios analitos, en una sola muestra o una serie de ellas. El mismo puede proveer resultados en la forma requerida o simplemente proveer datos sin tratar.

Los analizadores pueden ser clasificados de acuerdo a la forma en la que las muestras son transportadas y manipuladas en el sistema. A partir de esto tenemos:

✓ *Analizadores Discretos o Analizadores en Batch.* En estos sistemas la muestra preserva su integridad en un recipiente y es transportada mecánicamente a distintas zonas del analizador, donde de manera secuencial son llevados a cabo diferentes procedimientos analíticos, como ser dilución, agregado de reactivos, mezclado, calentamiento, etc. Finalmente, la muestra es llevada al detector, donde son registradas las señales.

✓ *Analizadores Continuos.* Están caracterizados por el uso de una corriente continua de líquido o en algunos casos gas. Las muestras, usualmente líquidas, son introducidas secuencialmente a intervalos regulares en un canal portando un líquido, pudiendo confluir o no, con otro canal portador de reactivos, solución

reguladora, etc. Una vez alcanzado el detector, generalmente provisto con una celda de flujo, la mezcla resultante genera una señal analítica que es registrada. Esta señal es de naturaleza transitoria y su altura es utilizada para calcular la concentración del analito. La línea de base entre señales representa el tiempo en el que la muestra no está pasando por el detector. Existen dos tipos de analizadores continuos:

a) Analizadores de flujo segmentado. En estos sistemas el flujo es segmentado por burbujas de aire, con el propósito de homogenizar las muestras, y éstas son removidas antes de llegar al detector.

b) Analizadores de flujo no-segmentado. Estos sistemas pueden clasificarse a su vez de acuerdo a si las muestras son inyectadas o fluyen continuamente en el sistema. De aquí surgen dos metodologías: *Análisis por Inyección en Flujo* y *Análisis en Flujo Completamente Continuo*.

✓ *Analizadores Robotizados.* Están basados en el uso de robots de alta precisión quienes simulan las acciones de un operador humano. Por medio de brazos mecánicos, el robot transporta la muestra o los productos formados en distintas etapas del proceso, a una serie de aparatos (dilutores, extractores, centrifugas, calentadores) e instrumentos (balanza, espectrofotómetro, cromatógrafo). En este caso, un microprocesador controla los movimientos del robot y la operación de todos los aparatos e instrumentos, de los cuales a su vez, recibe las correspondientes señales que serán tratadas quimiométricamente

para obtener los resultados finales ^[10].

En el presente trabajo de tesis se propone automatizar métodos de análisis para la determinación cuantitativa de: levodopa, carbidopa, dopamina, norepinefrina y epinefrina. Para ello se emplearon dos metodologías: *Análisis por Inyección en Flujo* y la novedosa metodología *Flow-Batch*.

1.2.2.1.1 *Análisis por Inyección en Flujo (FIA)*

El FIA fue presentado por Ruzicka y Hansen en el año 1975 ^[11]. Desde su aparición, se convirtió en una excelente alternativa para el desarrollo de métodos de análisis debido a aspectos tales como su versatilidad, rapidez, precisión, simplicidad, facilidad de operación, y bajos costos ^[12] ^[13]. Como es de amplio conocimiento, esta metodología se basa en la inserción de un determinado volumen de muestra dentro de una corriente portadora que fluye en forma continua. Durante el transporte de la muestra inyectada hacia el detector pueden ocurrir distintos procesos físicos, químicos o fisicoquímicos. Una vez que la muestra llega al detector, se registra la señal generada.

Los componentes básicos de un sistema FIA son:

^[10] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, *Automatic Methods of Analysis*, Elsevier, New York, 1988.

^[11] J. Ruzicka, E. Hansen, *Anal. Chim. Acta* 78 (1975) 145.

^[12] J. Ruzicka, E. Hansen, *Flow Injection Analysis*, John Wiley & Sons, New York, 1988.

^[13] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, *Flow Injection Analysis: Principles and Applications*, Ellis Horwood, Chichester, 1987.

- ✓ *Unidad de Propulsión.* Es la encargada de ingresar los fluidos al sistema. Generalmente es una bomba peristáltica.
- ✓ *Sistema de Inyección.* Posibilita la inserción de un volumen perfectamente medido de muestra en una corriente portadora.
- ✓ *Reactor.* A través del cual se produce el transporte de la muestra y donde ocurren los procesos físicos, químicos o fisicoquímicos.
- ✓ *Detector.* Los componentes antes mencionados se encuentran acoplados a un detector, el cual permite medir la señal generada en forma continua (Figura 1.5).

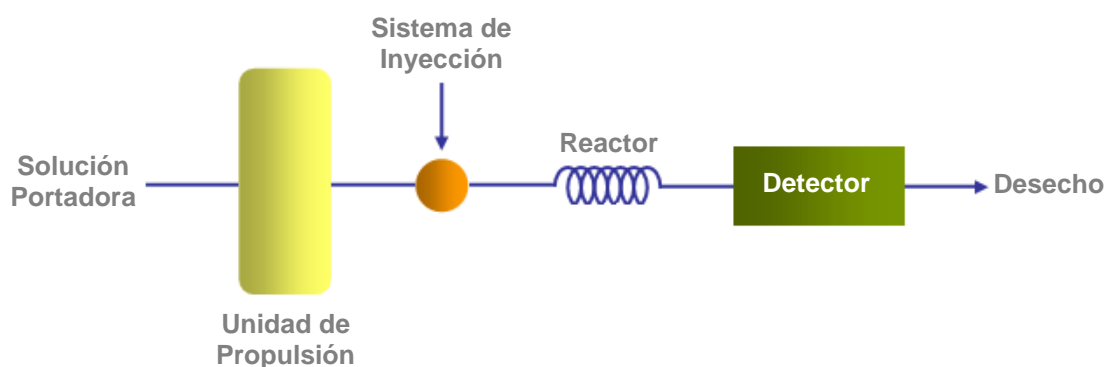


Figura 1.5. Componentes básicos de un sistema FIA.

Los métodos FIA pueden ser considerados cinéticos, pues se basan en la generación de señales transitorias debido a que se producen al menos dos procesos secuenciales: transporte y reacción. Estos procesos son los responsables del carácter cinético inherente a esta metodología. Además, son métodos cinéticos a tiempo fijo porque los parámetros se miden bajo condiciones de *no equilibrio*

(inestabilidad), a un tiempo exactamente controlado entre la inyección y el momento en que la zona de muestra llega al detector.

La señal transitoria FIA, que se obtiene como señal analítica en función del tiempo, es un pico característico cuyos parámetros más importantes son (Figura 1.6):

- ✓ *Altura de Pico (H)*. Se relaciona con la concentración del analito.
- ✓ *Tiempo de Residencia (T)*. Se define como el intervalo transcurrido entre la inyección de la muestra y la altura máxima de pico.
- ✓ *Tiempo de Retorno (T')*. Es el tiempo comprendido entre el máximo de pico y el retorno a la línea de base.
- ✓ *Tiempo de Transporte (t_a)*. Corresponde al período desde la inyección hasta el final de la línea de base.
- ✓ *Tiempo de Línea de Base a Línea de Base (Δt)*. Es el tiempo que transcurre desde que se inicia el pico hasta el retorno a la línea de base.

La forma característica del pico FIA es una representación gráfica de como se forma el gradiente de concentración en la zona de muestra, debido al proceso de dispersión o dilución parcial que sufre la misma durante su transporte a través del sistema. Esta dispersión debe ser controlada manipulando las características geométricas e hidrodinámicas del montaje correspondiente.

En base a esto, es claro ver que utilizando esta metodología se pueden llevar a cabo reacciones químicas (derivatizaciones) y separaciones no cromatográficas

(extracción, preconcentración, diálisis, filtración, etc.). Así mismo, se puede lograr el acoplamiento en línea del tratamiento de la muestra con los sistemas de detección.

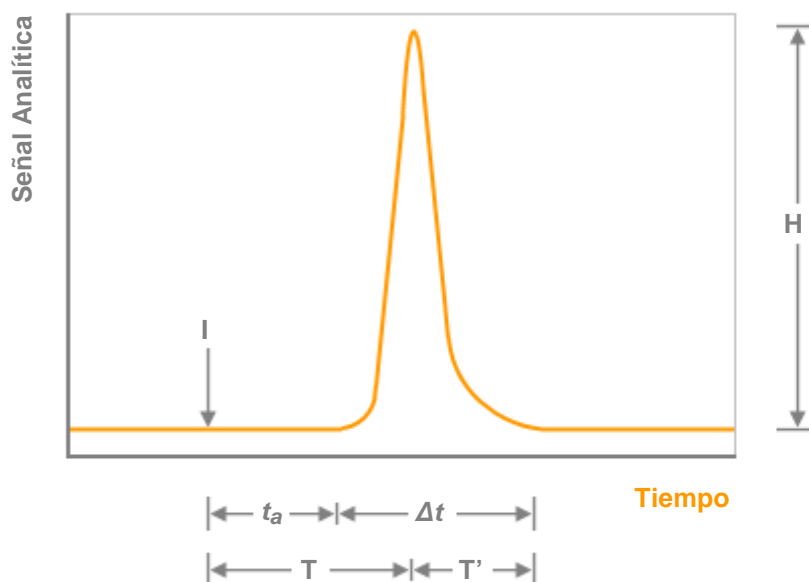


Figura 1.6. Parámetros de un pico FIA. Δt : tiempo de línea de base a línea de base; H: altura de pico; I: inyección; T: tiempo de residencia; T': tiempo de retorno; t_a : tiempo de transporte.

En este trabajo de tesis se propone un *sistema FIA con detección espectrofotométrica para la determinación enzimática y simultánea de levodopa y carbidopa en preparaciones farmacéuticas comerciales*. El mismo se utilizará para llevar a cabo *derivatizaciones y filtraciones en línea*. Por otro lado, se emplean distintas modalidades FIA: la *modalidad FIA de flujo detenido* y la *modalidad FIA reverso*.

a) *Derivatizaciones*. En sus comienzos la metodología FIA se empleaba,

fundamentalmente, para llevar a cabo derivatizaciones de los analitos o, en menor grado, de las posibles interferencias. En todos los casos, las reacciones son cinéticamente controladas y el objetivo principal es aumentar la sensibilidad y/o la selectividad del método analítico. Estos sistemas continuos contienen puntos de confluencia y reactores donde se llevan a cabo las reacciones químicas; mini-columnas o reactores, empacados con una fase sólida en la que se encuentra enlazado el reactivo; o se puede lograr la generación del reactivo en línea.

b) Filtraciones en Línea. En un proceso analítico automatizado una filtración generalmente se lleva a cabo con dos fines:

- ✓ Separar y coleccionar material sólido presente en muestras líquidas o gaseosas de manera de retener interferentes y realizar un “clean-up” de la muestra.
- ✓ Colectar el analito para la posterior determinación de su concentración.

Para llevar a cabo la operación de filtración en línea, se incorporan en el sistema filtros comerciales de distinto diámetro de poro. También se pueden desarrollar filtros con columnas de diferentes materiales (vidrio, tygon, teflón, etc.), longitudes y diámetros internos, rellenas con materiales tales como algodón, papel de filtro, carbón activado, de acuerdo al material a separar o retener en el filtro. La [Figura 1.7](#) muestra un montaje simple donde se desarrolla una reacción química. El sistema tiene incluido un filtro para realizar un “clean-

up” de la muestra.

c) *Modo FIA de Flujo Detenido*. El modo FIA de flujo detenido tiene dos propósitos diferentes:

- ✓ Aumentar la sensibilidad de la señal analítica debido al aumento del tiempo de residencia.
- ✓ Registrar la curva de velocidad de reacción en la cual se basa el resultado analítico.

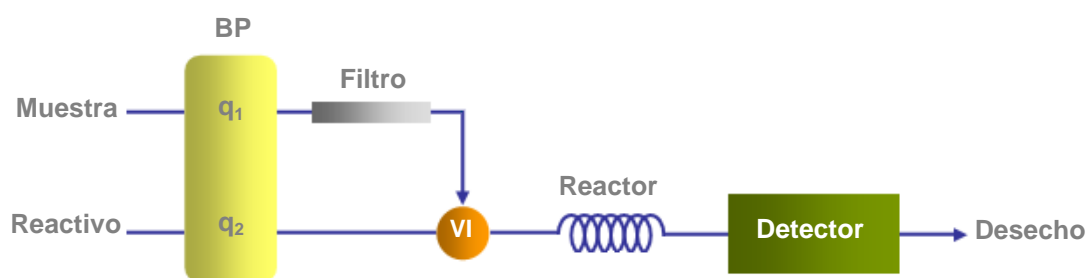


Figura 1.7. Sistema FIA para realizar una derivatización. El mismo presenta un filtro que permite realizar un “clean-up” de la muestra en línea. BP: bomba peristáltica; q_1 , q_2 : caudales de la muestra y reactivo, respectivamente; VI: válvula de inyección.

Al detener el flujo cuando la zona de muestra está en la celda, se puede medir el cambio de la señal analítica durante el tiempo que está detenido el mismo. El flujo se detiene luego del tiempo de residencia (T), lo que implica que el reactivo se encuentra en exceso respecto de la muestra, favoreciéndose por lo tanto el progreso de la reacción. En la [Figura 1.8](#) se esquematiza el perfil del pico FIA obtenido cuando el flujo se detiene poco tiempo después de

transcurrido el tiempo de residencia. Considerando a t_0 como el tiempo en el que se efectúa la inyección y a t_1 y t_2 como los tiempos en los cuales se detiene y reestablece el flujo, respectivamente, podemos definir:

- ✓ *Tiempo Transcurrido hasta Detener el Flujo.* El cual está comprendido entre t_1 y t_0 ($\Delta t_1 = t_1 - t_0$) y representa el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra en la solución portadora y el tiempo al cual se detiene el flujo.
- ✓ *Tiempo de Flujo Detenido.* Comprende entre t_2 y t_1 ($\Delta t_2 = t_2 - t_1$) y representa el tiempo durante el cual el flujo está detenido y por lo tanto parte de la muestra permanece en la celda.

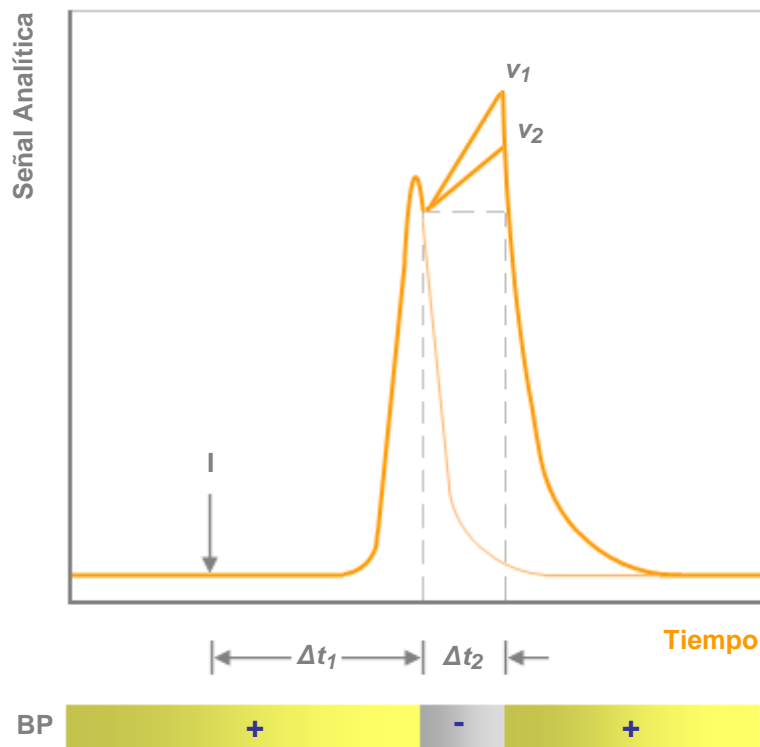


Figura 1.8. Pico FIA generado al detener el flujo en la celda. La línea naranja claro es una proyección del pico FIA sin detención del flujo. BP: bomba peristáltica (+) encendida, (-) detenida; I: inyección; v_1 y v_2 : diferentes velocidades de reacción.

También se puede detener el flujo cuando la zona de muestra alcanza el reactor donde se produce la reacción química. Esto significa aumentar el tiempo de residencia, lo que generará un aumento significativo de la sensibilidad de la señal, dado que durante ese lapso no se produce dispersión de la zona de muestra.

d) *Modalidad FIA Reverso*. En este tipo de sistemas se realiza la inyección del *reactivo* en una corriente de *muestra*. Esta modalidad es apropiada en casos en los cuales la muestra es abundante y se pretenden utilizar mínimas cantidades de reactivo, lo que permite reducir los costos del análisis. Por otro lado, en muchos casos, esta modalidad permite un incremento de la sensibilidad de la medida analítica.

1.2.2.1.2 *Flow-Batch (FB)*

Los sistemas FB fueron desarrollados por Araújo y col. en el año 1999 ^[14]. Desde entonces, debido a su gran versatilidad, rapidez, precisión, facilidad de operación y bajos costos, han sido utilizados en numerosas aplicaciones, como ser: titulaciones ^[14] ^[15], adición estándar ^[16] ^[17], estándar interno ^[18], análisis de *screening* ^[19],

^[14] R.S. Honorato, M.C.U. Araújo, R.A.C. Lima, E.A.G. Zagatto, R.A.S. Lapa, J.L.F. Costa Lima, *Anal. Chim. Acta* 396 (1999) 91.

^[15] R.S. Honorato, M.C.U. Araújo, R.A.C. Lima, E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 416 (2000) 231.

^[16] L.F. Almeida, V.L. Martins, E.C. Silva, P.N.T. Moreira, M.C.U. Araújo, *Anal. Chim. Acta* 486 (2003) 143.

^[17] L.F. Almeida, V.L. Martins, E.C. Silva, P.N.T. Moreira, M.C.U. Araújo, *J. Braz. Chem. Soc.* 14 (2003) 249.

exploración de gradientes de concentración ^[20], ajuste de pH ^[21] y fuerza iónica ^[22], y digestión de muestras ^[23].

Los sistemas FB pueden considerarse sistemas híbridos, ya que combinan las ventajas intrínsecas de los sistemas de flujo continuo con las ventajas inherentes a los métodos en batch.

Los componentes básicos de un sistema FB son:

✓ *Unidad de Propulsión.* Es la encargada de movilizar los fluidos en el sistema.

Se utiliza, en la mayoría de los casos, una bomba peristáltica que es comandada desde una computadora a través de una interfase de control. También pueden utilizarse microbombas solenoides.

✓ *Válvulas Solenoides.* Posibilitan la inserción de un volumen perfectamente conocido de reactivos y de muestra en la cámara de mezclado, y la salida desde la misma del/los producto/s de reacción.

✓ *Cámara de Mezclado.* Es el lugar donde confluyen los reactivos y la muestra y, en consecuencia, se llevan a cabo los procesos físicos, químicos o fisicoquímicos. Generalmente es confeccionada en Teflón® y presenta dos o más vías de entrada y una vía de salida. El volumen interno puede adaptarse a las

^[18] J.E. da Silva, F.A. da Silva, M.F. Pimentel, R.S. Honorato, V.L. da Silva, B.S.M. Montenegro, A.N. Araújo, *Talanta* 70 (2006) 522.

^[19] R.A.C. Lima, S.R.B. Santos, R.S. Costa, G.P.S. Marccone, R.S. Honorato, V.B. Nascimento, M.C.U. Araújo, *Anal. Chim. Acta* 518 (2004) 25.

^[20] E.P. Medeiros, E.C.L. Nascimento, A.C.D. Medeiros, J.G.V. Neto, E.C. da Silva, M.C.U. Araújo, *Anal. Chim. Acta* 511 (2004) 113.

^[21] R.S. Honorato, J.M.T. Carneiro, E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 441 (2001) 309.

^[22] J.M.T. Carneiro, A.C.B. Dias, R.S. Honorato, E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 455 (2002) 327.

^[23] R.S. Honorato, M.T. Carneiro, E.A.G. Zagatto, *J. Anal. Chem.* 368 (2000) 496.

necesidades particulares del método a desarrollar (Figura 1.9). La misma puede contener una o dos ventanas de cuarzo de manera tal que pueda utilizarse también como celda de detección.



Figura 1.9. Fotografía de una cámara de mezclado con cuatro vías de entrada, una vía de salida y un volumen interno de 4 mL.

✓ *Accionador Electrónico de Válvulas Solenoides.* Posibilita la apertura y cierre de las válvulas solenoides. El circuito electrónico del accionador está diseñado para enviar un pulso eléctrico de 12 V cuando recibe más de 3,8 V en sus entradas proveniente del puerto paralelo de la computadora a través de una interfase de control. Esta potencia resulta suficiente para abrir las válvulas solenoides. Cuando el pulso cae, la válvula se cierra (Figura 1.10).

✓ *Interfase de Control.* Envía las señales de control provenientes del puerto paralelo de la computadora al accionador de válvulas solenoides, la bomba peristáltica y, si es posible, al instrumento de detección.

- ✓ *Computadora y Software.* Todos los componentes del sistema son controlados por software, el cual puede ser escrito utilizando distintos lenguajes de programación (LabView®, Delphi®, etc.). De esta forma, todos los pasos del procedimiento se llevan a cabo de forma completamente automática.
- ✓ *Detector.* Los componentes antes mencionados se encuentran acoplados a un detector, el cual es el encargado de registrar la señal analítica generada en la reacción química.



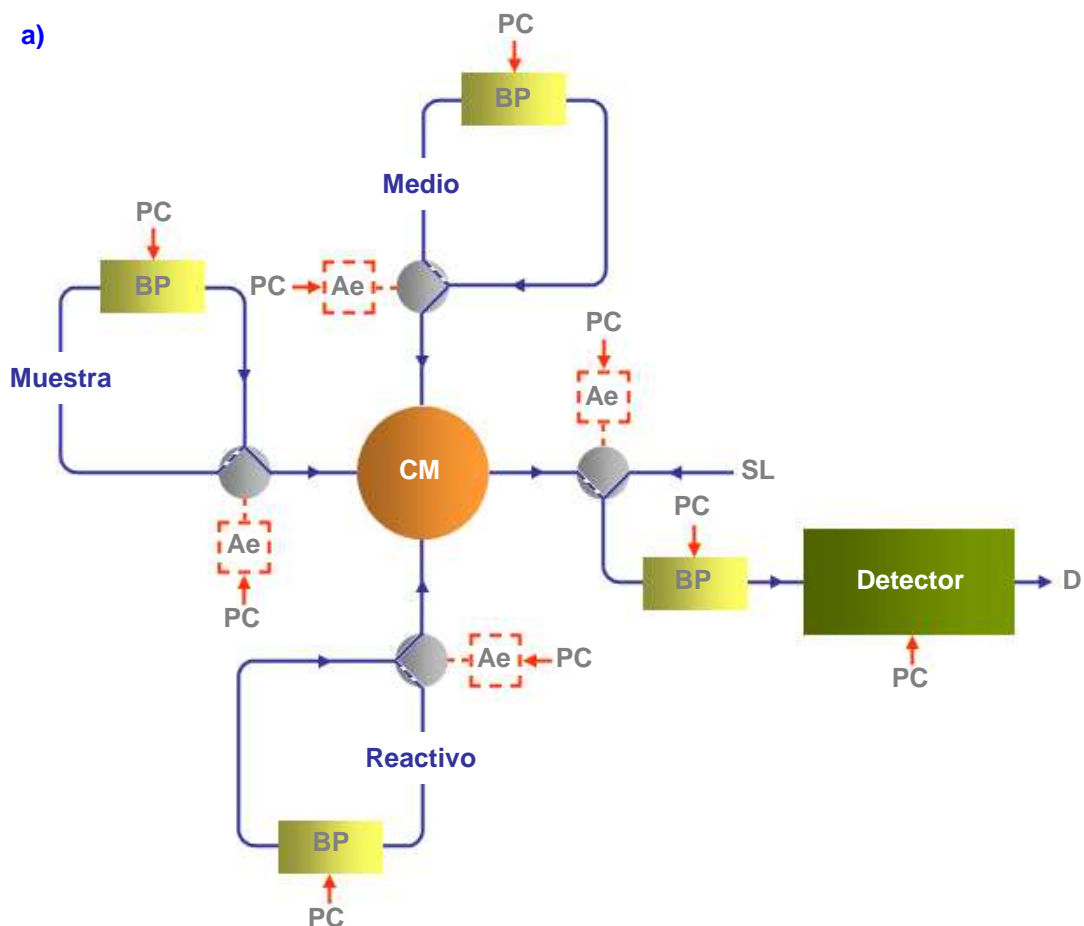
Figura 1.10. Fotografía de un accionador electrónico de válvulas solenoides. El mismo fue construido en el laboratorio y presenta capacidad para la conexión de 7 válvulas. Eventualmente, y si la configuración del sistema lo permite, las entradas pueden utilizarse para conectar una bomba peristáltica, un agitador magnético o cualquier otro tipo de dispositivo que se desee controlar vía software en el sistema FB.

En un sistema FB se introduce la muestra, el medio y el reactivo en una cámara de mezclado, de forma secuencial o bien simultáneamente. De esta manera, se da comienzo a la reacción y la señal generada puede registrarse de dos formas:

a) En una Celda de Flujo. En este caso, la mezcla sale de la cámara y se dirige a

una celda de flujo donde se realiza la detección (Figura 1.11a). En la misma puede detenerse el flujo, con el objetivo de aumentar el tiempo de reacción, y en consecuencia la sensibilidad.

b) *En la Cámara de Mezclado.* En este caso, se lleva a cabo la detección en la cámara de mezclado (Figura 1.11b). Como se mencionó anteriormente, la cámara puede presentar una o dos ventanas, ubicadas convenientemente según la técnica de detección a utilizar (UV-visible, fluorescencia, quimioluminiscencia, etc.).



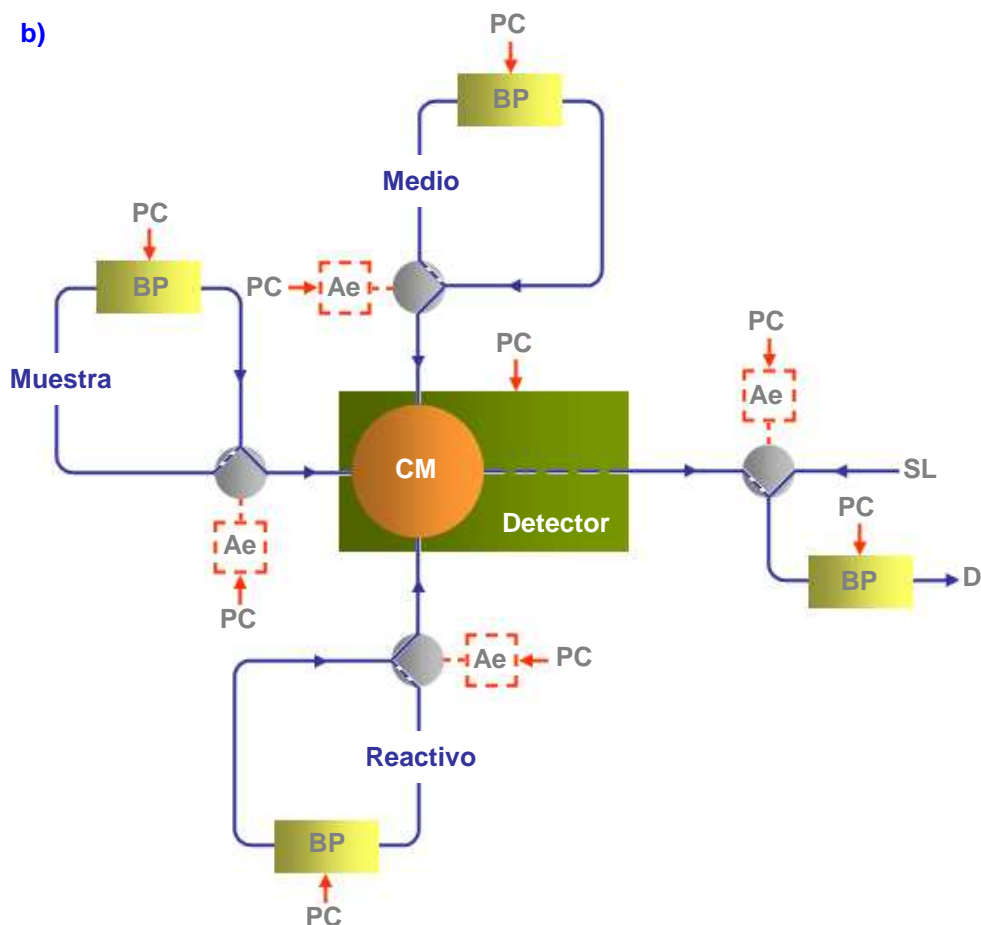


Figura 1.11. Componentes básicos de un sistema FB. Ae: accionador electrónico; BP: bomba peristáltica; CM: cámara de mezclado; D: desecho; PC: computadora; SL: solución de lavado para la celda de detección. Las válvulas solenoides están representadas por círculos grises. Las flechas azules indican la dirección de desplazamiento de los fluidos. Las flechas rojas representan la interfase paralela de comunicación a la computadora. **a)** Un sistema FB en el que la detección se realiza en una celda de flujo. **b)** Un sistema FB en el que se utiliza la cámara de mezclado como celda de detección.

La principal ventaja de esta modalidad es la posibilidad de registrar la señal desde el momento en que se da comienzo a la reacción. Esto resulta especialmente útil cuando se trabaja en quimioluminiscencia. Por otro lado, la

cercanía entre el detector y la cámara mejora la sensibilidad.

Como puede apreciarse, esta novedosa metodología presenta una gran versatilidad, lo que hace posible la automatización de diversos tipos de reacciones químicas. Por otro lado, se pueden incorporar al sistema, y de un modo muy sencillo, filtros que permitan realizar separaciones.

En este trabajo de tesis se proponen dos sistemas FB:

- ✓ El primero, con *detección espectrofotométrica, para la determinación enzimática y simultánea de levodopa y carbidopa.*
- ✓ El segundo, con *detección quimioluminiscente, para la determinación de dopamina, norepinefrina y epinefrina.*

Todos estos analitos se estudiaron en preparaciones farmacéuticas comerciales.

Capítulo 2



OBTENCIÓN DE POLIFENOL

OXIDASA A PARTIR DE BATATAS

- 2.1 OBJETIVO**
 - 2.2 INTRODUCCIÓN**
 - 2.3 PARTE EXPERIMENTAL**
 - 2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**
 - 2.5 CONCLUSIONES PARCIALES**
-

En esta primera parte del trabajo, el objetivo es obtener un extracto crudo de batatas (*Ipomoea batatas*) conteniendo la enzima Polifenol oxidasa (PFO). El mismo será posteriormente utilizado para la determinación espectrofotométrica simultánea de levodopa y carbidopa en preparados farmacéuticos.

2.2 INTRODUCCIÓN

Las *enzimas* son proteínas con actividad catalítica que se encuentran presentes en todos los sistemas biológicos. La catálisis tiene lugar en un centro específico de la enzima denominado *centro activo* y las moléculas sobre las que actúa se denominan *sustratos*. Las enzimas aceleran las reacciones en un orden de 10^3 a 10^{11} veces respecto a las reacciones no catalizadas enzimáticamente. Por otro lado, son altamente selectivas para un número limitado de sustratos, dado que éstos deben unirse estereoespecíficamente al centro activo.

La actividad de algunas enzimas depende solamente de la estructura proteica, mientras que otras necesitan además estructuras no proteicas denominadas *cofactores*. El cofactor puede ser un ión metálico (Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , etc.), o una molécula orgánica compleja (adenosil trifosfato, nicotinamida, ácido fólico, etc). El complejo enzima-cofactor, catalíticamente activo, recibe el nombre de *holoenzima*. Cuando se separa el cofactor, la proteína restante (inactiva catalíticamente) se designa con el nombre de *apoenzima* (Figura 2.1).

Para que se produzca actividad enzimática, el sustrato debe tener la forma adecuada para introducirse en el centro activo. La especificidad de este enlace, en el que intervienen fuerzas de corto alcance, depende de la disposición exactamente definida de los átomos que conforman dicho centro. Una vez producida esta unión, se produce la conversión química del sustrato inicial en un nuevo compuesto.

Por último, el producto se libera y la enzima queda disponible para iniciar un nuevo ciclo catalítico. (Figura 2.2) ^[24].

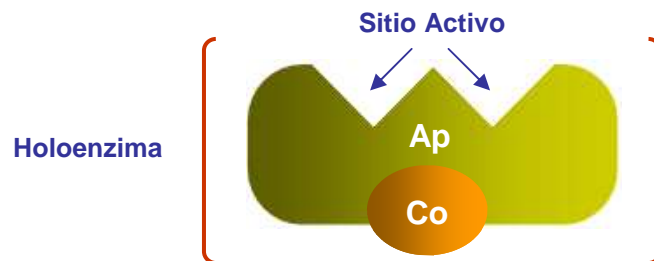


Figura 2.1. Complejo enzima-cofactor (holoenzima) y su correspondiente sitio activo. Ap: apoenzima; Co: cofactor.

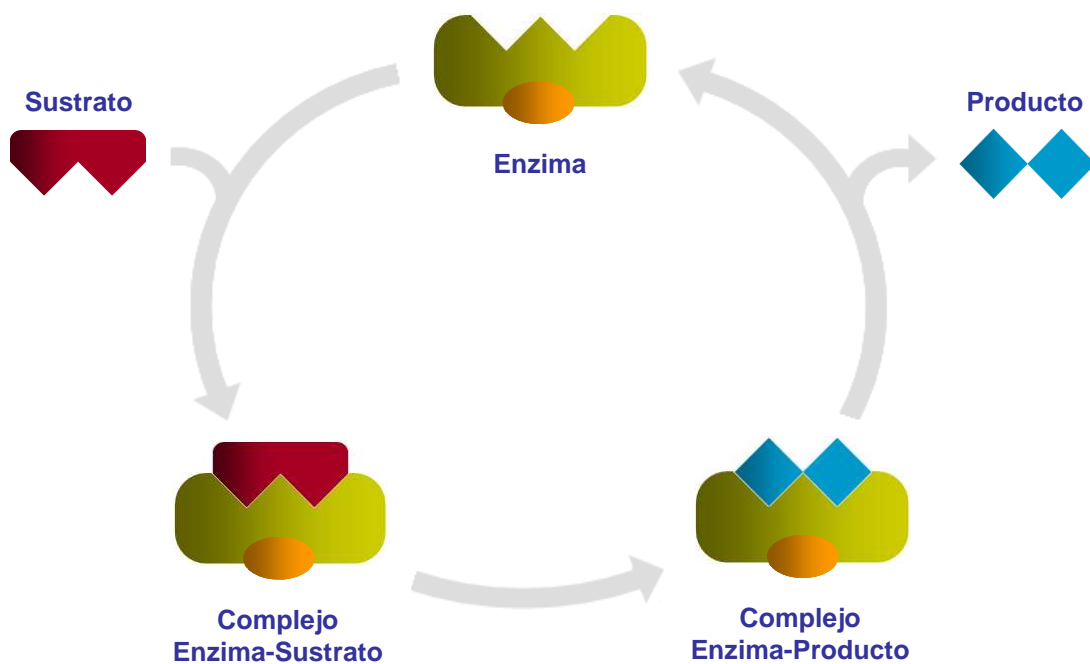


Figura 2.2. Catálisis enzimática y especificidad del enlace enzima-sustrato. Luego de la reacción la enzima queda disponible para iniciar un nuevo ciclo catalítico.

^[24] D.L. Nelson, M.M. Cox. Lehninger-Principios de Bioquímica, Omega, Barcelona, 2000.

En términos generales, podemos decir que las enzimas se caracterizan por las siguientes propiedades:

- ✓ *Aceleran el proceso para alcanzar el equilibrio químico en una reacción reversible.*
- ✓ *Son altamente específicas.* La acción de la enzima es extremadamente selectiva sobre un determinado sustrato.
- ✓ *No sufren cambios luego de las reacciones químicas en las que participan.*
- ✓ *Son eficaces en pequeñas cantidades.*

2.2.1 Factores que Afectan a las Reacciones Enzimáticas

La actividad enzimática está afectada por una serie de parámetros externos entre los que principalmente se encuentran:

- ✓ *Concentración de Sustrato.* La [Figura 2.3](#) muestra el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de formación del producto, en una reacción de un solo sustrato. Michaelis y Menten ^[25] demostraron que la relación hiperbólica entre velocidad y concentración de sustrato puede ser expresada por:

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Ecuación 2.1}$$

donde v es la velocidad medida experimentalmente, $V_{m\acute{a}x}$ es la velocidad máxima

^[25] L. Michaelis, L. Menten, *Biochem. Z.* 49 (1913) 333.

cuando la enzima está saturada con sustrato, K_m es la concentración de sustrato cuando $v = 0,5 V_{max}$ y $[S]$ es la concentración de sustrato a cualquier tiempo t de la reacción. La relación hiperbólica entre velocidad y concentración de sustrato se debe a la existencia del complejo enzima-sustrato, que es un estado intermedio previo a la conversión del sustrato en producto.

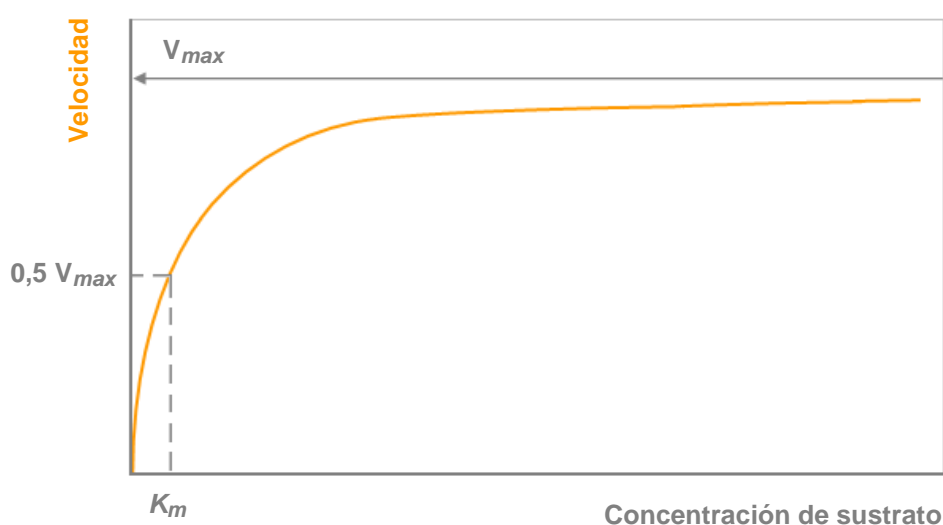


Figura 2.3. Variación de la velocidad de catálisis con el aumento de la concentración de sustrato para una reacción enzimática que obedece la cinética de Michaelis-Menten.

✓ **Concentración de Enzima.** La relación entre velocidad y concentración de enzima es usualmente lineal si el resto de los factores, tales como concentración de sustrato, temperatura y pH, se mantienen constantes. Esta relación lineal es muy útil, ya que permite conocer cuanta enzima hay presente midiendo su actividad en condiciones estándar, sin necesidad de purificar la enzima. La determinación de la *actividad enzimática (AE)* puede ser usada no sólo para

determinar la presencia de una enzima (cualitativamente) sino para determinar cuanta enzima hay presente en un extracto basándonos en la velocidad en condiciones controladas. Esto es importante en el uso analítico de las enzimas para la determinación de compuestos que son sustratos, activadores o inhibidores.

✓ *Temperatura.* La temperatura afecta tanto a la velocidad de catálisis como también a la estabilidad de la enzima, al equilibrio de todas las reacciones de asociación/disociación (ionización del buffer, del sustrato, del producto, de los cofactores y del complejo enzima-sustrato) a la solubilidad de los sustratos y a la ionización de grupos prototrópicos en el centro activo de la enzima y en el complejo enzima-sustrato. En la [Figura 2.4](#) se puede observar el estudio realizado por Fatibello y col. ^[26] sobre el efecto de la temperatura en la reacción de oxidación catalizada por PFO de levodopa (uno de los analitos estudiados en este trabajo de tesis).

✓ *pH.* El pH óptimo para cada tipo de enzima depende del estado particular de ionización del sustrato unido a la misma. Esto a su vez está relacionado con la ionización de aminoácidos específicos que constituyen el centro de fijación del sustrato y aquellos implicados en la catálisis ^{[25] [27] [28]}. En la [Figura 2.5](#) se puede observar el efecto del pH en la reacción de oxidación de levodopa catalizada por PFO. Los datos también fueron obtenidos de Fatibello y col. ^[26].

^[26] O. Fatibello-Filho, I. da Cruz Vieira, *Analyst* 122 (1997) 345.

^[27] O.R. Fennema, *Química de los Alimentos*, Acribia, Zaragoza, 2000.

^[28] T.M. Devlin, *Bioquímica*, Reverté, Barcelona, 1999.

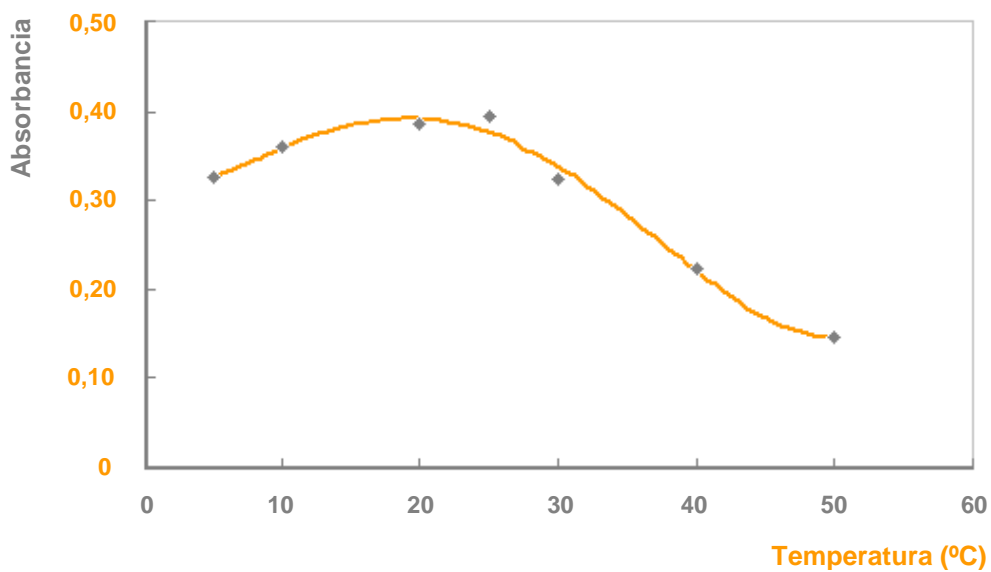


Figura 2.4. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de catálisis expresada como la absorbancia registrada a 500 nm para una solución de levodopa.

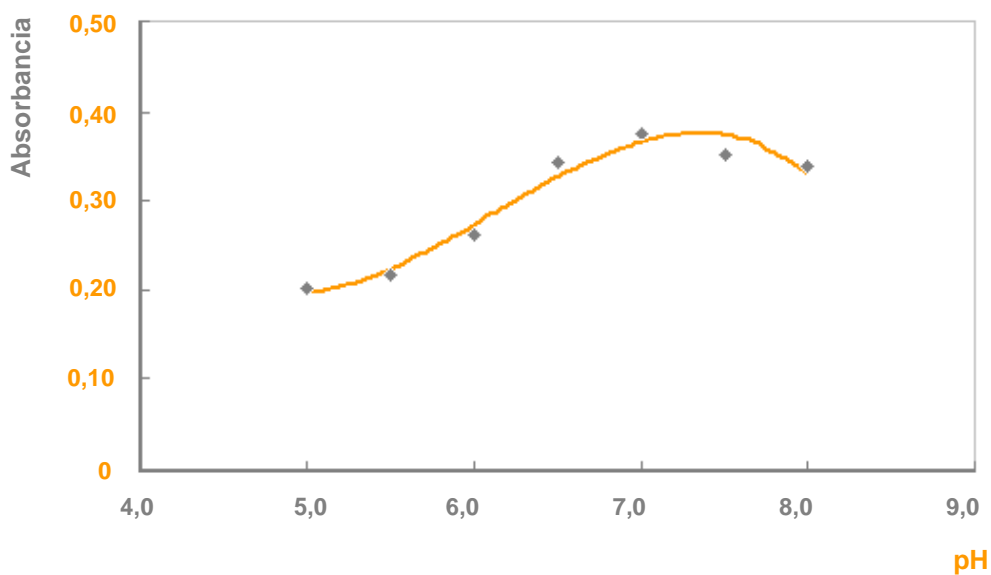


Figura 2.5. Efecto del pH sobre la velocidad de catálisis expresada como la absorbancia registrada a 500 nm para una solución de levodopa.

2.2.2 Polifenol Oxidasa (PFO)

La PFO es una metaloenzima que se encuentra presente en organismos procariotas y eucariotas. Se encuentra ampliamente distribuida en vegetales donde forma parte de los mecanismos de defensa. Una lesión, corte o infección en un tejido vegetal produce la interacción de la enzima con sustratos fenólicos, tales como el ácido clorogénico, las catequinas, las leucoantocianidinas, las antocianinas y los flavonoides. Esto da lugar a la formación de o-quinonas, las que pueden unirse a proteínas inactivándolas, o bien pueden polimerizar dando lugar a melaninas que oscurecen o pardean la zona afectada haciéndola poco accesible para patógenos oportunistas e invasiones bióticas.

2.2.2.1 Estructura y Mecanismo Catalítico de la PFO

Las PFOs han sido aisladas y estudiadas a partir de una amplia variedad de plantas, animales y especies de hongos. En todos los casos las PFOs son metaloenzimas que contienen dos átomos de cobre en el sitio activo, los cuales son coordinados individualmente con tres residuos de histidina. La enzima PFO de batata consta de una sola cadena polipeptídica con un tamaño de 39 kDa. Klabunde y col. ^[29] describieron la estructura de la PFO de batata tras realizar estudios mediante difracción de rayos X de la proteína cristalizada. Los mismos proponen que el centro activo de la PFO esta formado por un pequeño bolsillo hidrofóbico

^[29] T. Klabunde, C. Eicken, J.C. Sacchettini, B. Krebs, *Nat. Struct. Biol.* 5 (1998) 1084.

cerca de la superficie de la proteína funcional, conformado por cuatro hélices tipo alfa y que contiene dos átomos de cobre (II) (Cu A y Cu B) unidos a histidina (Figura 2.6).

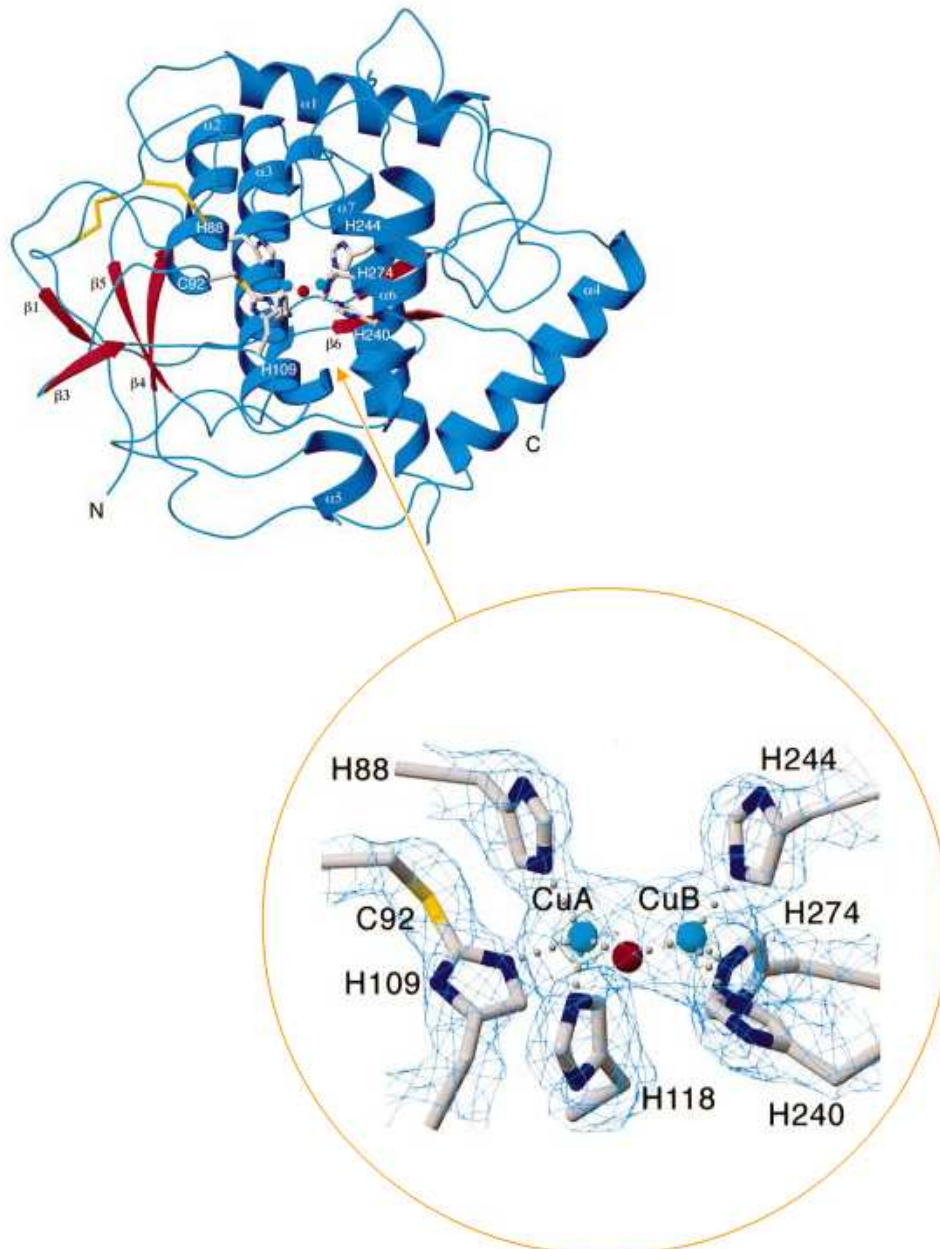


Figura 2.6. Representación estructural de la PFO de batata (*Ipomoea batata*) y del sitio activo con sus dos átomos de cobre (CuA y CuB) coordinados con tres residuos de histidina cada uno y una molécula de solvente (esfera roja). Adaptado de ^[29].

En cuanto al mecanismo de reacción debe considerarse que las PFOs vegetales son oxireductasas que suelen presentar doble actividad: *monofenolasa* y *difenolasa* [30] (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Actividades catalíticas y nomenclatura de las PFOs vegetales.

ACTIVIDAD	NOMENCLATURA ^a Y REACCIÓN CATALIZADA
A- Monofenolasa	Monofenol monooxigenasa/ EC 1.14.18.1
	$L\text{-tirosina} + L\text{-dopa} + O_2 \longrightarrow L\text{-dopa} + \text{dopaquinona} + H_2O$
B- Difenolasa	Catecol oxidasa/ EC 1.10.3.1
	$2 \text{ catecol} + O_2 \longrightarrow 2 \text{ 1,2-benzoquinona} + 2 H_2O$

^a Nomenclatura común/systemática para las PFOs según recomienda el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB).

Cuando presentan actividad monofenolasa (A), los compuestos monofenólicos se transforman en difenoles. En el caso de presentar actividad difenolasa (B), los o-difenoles presentes o formados en la reacción anterior pasan a o-quinonas [31] (Figura 2.7). Las o-quinonas así formadas son compuestos de color amarillento, muy reactivas e inestables, que pueden reaccionar con nucleófilos como por ejemplo grupos amino, tiol de proteínas y aminoácidos libres mediante un mecanismo no enzimático. Además, las o-quinonas pueden reaccionar covalentemente con otros compuestos fenólicos para formar compuestos

[30] J.C. Vela, Aproximación cinética, molecular y proteómica al estudio de podredumbre apical en frutos de tomate. Implicación de polifenol oxidasa y enzimas antioxidantes, Universidad de Alicante, 2004.

[31] C. Lee, J. Whitaker, Enzymatic browning and its prevention, ACS Symposium Series 600, American Chemical Society, 1995.

poliméricos de colores intensos que varían entre amarillo, rojo, verde o negro.

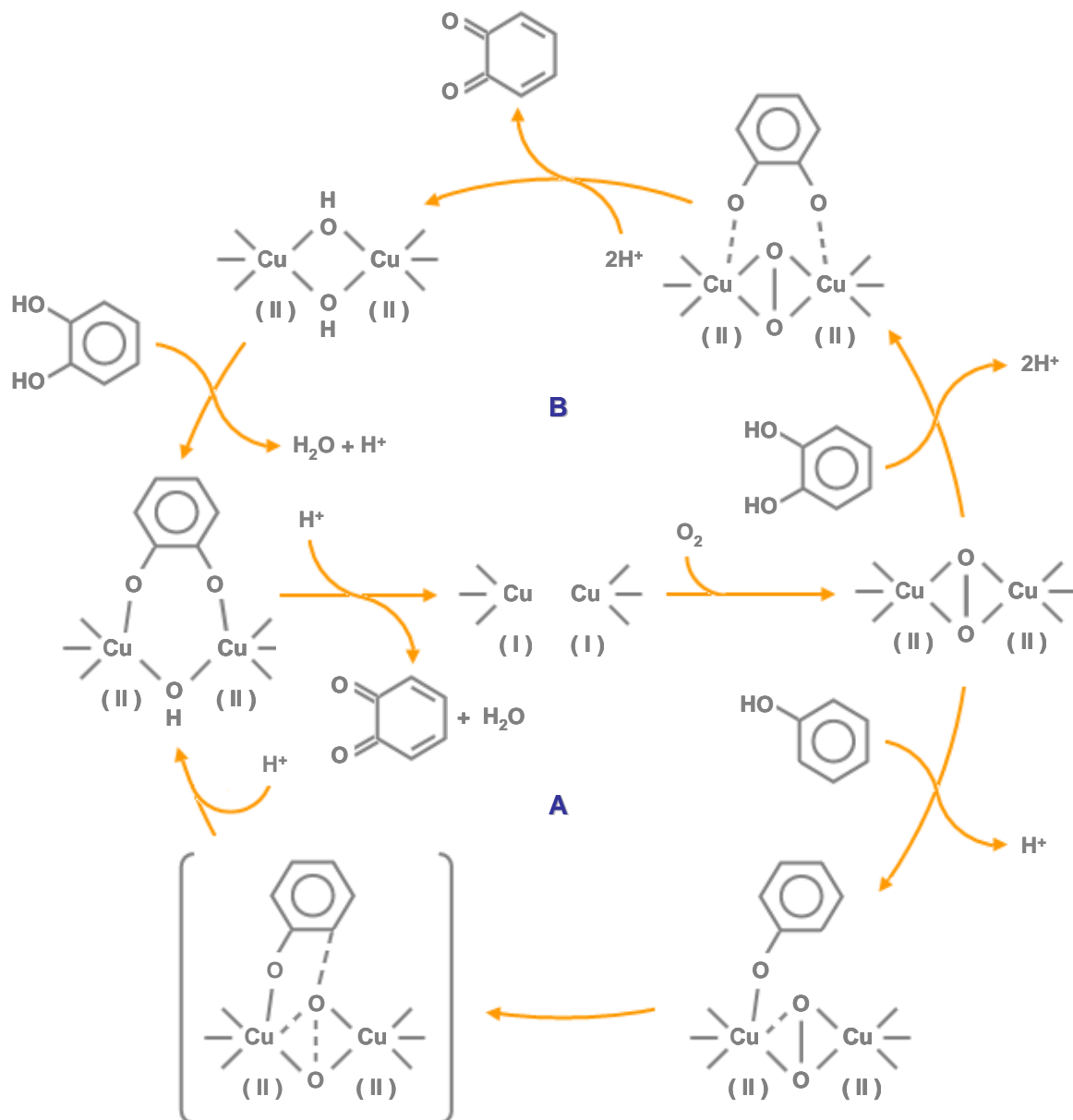


Figura 2.7. Mecanismo propuesto por Lee y Whitaker ^[31] para la oxidación de monofenoles (A) y difenoles (B) por medio de PFO.

2.2.2.2 Aplicaciones

La utilización de nuevos materiales biocatalíticos en lugar de enzimas puras para

el desarrollo de biosensores y/o métodos enzimáticos de análisis, ofrece importantes ventajas, como ser bajo costo y mayor tiempo de conservación. Células bacterianas [32] [33] tejidos vegetales y animales [34] [35] [36] [37] [38] y extractos crudos de origen vegetal [39] [40] [41] [42] han sido ampliamente utilizados. Hacia fines de los años ochenta, Uchiyama y col. utilizaron un extracto crudo de pepinos conteniendo la enzima *ascorbato oxidasa* como solución carrier, en un sistema de inyección en flujo, para la determinación de ácido L-ascórbico [39] y ácido deshidroascórbico [40]. Un tiempo después, el mismo autor utilizó extractos de pulpa de banana y hojas de espinaca como fuente de PFO para la determinación de dopamina, catecol y epinefrina [41]. En ese trabajo, el consumo de oxígeno en la reacción enzimática fue monitoreado por medio de un electrodo de oxígeno y la disminución de su concentración fue inversamente proporcional a la concentración del sustrato fenólico. Sin embargo, el extracto de hojas de espinaca presentó baja actividad

[32] G.A. Rechnitz, R.K. Kobos, T.I. Riechel, C.R. Gebaner, *Anal. Chim. Acta* 94 (1977) 357.

[33] G.A. Rechnitz, R.K. Kobos, T.I. Riechel, M.E. Meyerhoff, *Science* 199 (1978) 440.

[34] G.A. Rechnitz, M.A. Arnold, M.E. Meyerhoff, *Nature* 278 (1979) 466.

[35] M.A. Arnold, G.A. Rechnitz, *Biosensors Based on Plant and Animal Tissue*, in: A.F.P. Turner, I. Karube, G. Wilson (Eds.), *Biosensors-Fundamental and Applications*, Oxford University Press, Oxford, 1987.

[36] M.S. Lin, J. Wang, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1545.

[37] L. Macholán, *Biocatalytic Membrane Electrodes*, in: D.L. Wise (Ed.), *Bioinstrumentation and Biosensors*, Marcel Dekker, New York, 1991.

[38] F. Mazzei, F. Botre, M. Lanzi, G. Lorenti, F. Porcelli, C. Botre, *Sensors and Actuators B7* (1992) 427.

[39] S. Uchiyama, Y. Tofuku, S. Suzuki, *Anal. Chim. Acta* 208 (1988) 291.

[40] S. Uchiyama, S. Suzuki, *Bunseki Kagaku* 39 (1990) 793.

[41] S. Uchiyama, S. Suzuki, *Anal. Chim. Acta* 261 (1992) 361.

[42] I. da Cruz Vieira, O. Fatibello-Filho, *Anal. Chim. Acta* 366 (1998) 111.

enzimática poco tiempo después de la obtención. Antes de la centrifugación, el homogenado debió refrigerarse 24 h a 4 °C para favorecer la liberación de la PFO de las células y el tiempo de vida del extracto fue de solo 7 días a 4 °C. Por otro lado, en el caso de un extracto de pulpa de banana, es necesaria una oxidación previa del mismo con aire y un mes de almacenamiento antes de su utilización. En general, los procedimientos de obtención de los extractos enzimáticos resultaron complicados y presentaron relativamente baja actividad enzimática.

En los últimos años, fueron publicados métodos más sensibles para la determinación de diferentes especies químicas utilizando extractos crudos conteniendo PFO. J. Michalowski y col. ^[43] propusieron un sistema FIA con detección quimioluminiscente para la determinación de epinefrina utilizando un extracto crudo de manzanas como fuente de PFO. I. da Cruz Vieira y col. ^[44] desarrollaron un método espectrofotométrico para la determinación de metildopa y dopamina en preparados farmacéuticos, usando un extracto crudo de batatas (*Ipomoea batatas*) como fuente de PFO. El mismo extracto fue utilizado mas tarde para desarrollar un biosensor con detección quimioluminiscente para la determinación de dopamina libre en sangre de conejo mediante un sistema FIA, en el cual la microdiálisis de la muestra fue realizada en línea ^[45]. El mismo analito fue cuantificado amperométricamente en preparados farmacéuticos utilizando un biosensor de pasta de carbono modificado con un 25 % p/p de PFO obtenida de

^[43] J. Michalowski, P. Halaburda, *Talanta* 55 (2001) 1165.

^[44] I. da Cruz Vieira, O. Fatibello-Filho, *Talanta* 46 (1998) 559.

^[45] B. Li, Z. Zhang, Y. Jin, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 585.

graviola (*Annona muricata*) [46].

Por otro lado, nuestro grupo de trabajo desarrolló recientemente un sistema FIA con detección espectrofotométrica para la determinación de fenoles totales en orina utilizando PFO obtenida de batatas [47].

[46] V.S. Bezerra, J.L. de Lima Filho, M.C.B.S.M. Montenegro, A.N. Araújo, V.L. da Silva, J. Pharm. Bio. Anal. 33 (2003) 1025.

[47] M. Grünhut, M.E. Palomeque, A.G. Lista, B.S. Fernández Band, Talanta 71 (2007) 1520.

2.3 PARTE EXPERIMENTAL

Los extractos crudos conteniendo PFO se obtuvieron a lo largo del trabajo de tesis en dos laboratorios:

- ✓ Laboratorio FIA, Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina. Los extractos allí obtenidos fueron utilizados para la determinación simultánea de levodopa (LVD) y carbidopa (CBD) mediante un sistema FIA y PLS-1 (Capítulo 3, Parte A).
- ✓ Laboratorio de Quimiometría y Automatización (LAQA), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil. En este caso, los extractos fueron utilizados para la determinación simultánea de LVD y CBD mediante un sistema FB y MLR-SPA (Capítulo 3, Parte B).

2.3.1 Equipamiento

En el Laboratorio FIA:

- ✓ Centrífuga automática-refrigerada Sorvall (20.000 rpm).
- ✓ Espectrofotómetro UV-visible con arreglo de diodos Hewlett Packard modelo 8452 A.
- ✓ pHmetro Orion modelo 710 A.

En el LAQA:

- ✓ Centrífuga automática-refrigerada Sigma (20.000 rpm).
- ✓ Espectrofotómetro UV-visible con arreglo de diodos Hewlett Packard modelo 8453.
- ✓ pHmetro Metrohm modelo 713.

2.3.2 Reactivos y Soluciones

Todas las soluciones se prepararon con agua ultra pura (18 mΩ) y todos los reactivos químicos que se utilizaron fueron de grado analítico.

- ✓ Resina de intercambio aniónico Dowex de 100-200 mesh (Fluka).
- ✓ Solución reguladora de fosfato 0,1 mol L⁻¹ de pH 7,0.
- ✓ Solución de azida de sodio 0,015 % (Sigma).
- ✓ Solución patrón de catecol 0,05 mol L⁻¹. La misma se preparó disolviendo 0,1375 g de catecol (Anedra) en 25 mL de solución reguladora de fosfato de pH 7,0. Las soluciones testigo fueron preparadas por dilución apropiada de la solución patrón con solución reguladora.

2.3.3 Metodología Analítica

2.3.3.1 Extracción de PFO a partir de Batatas

En primer lugar, se conservó una batata (*Ipomoea batatas*) a una temperatura de -18 °C durante siete días. Luego, la misma se trozó en pequeñas partes y se

pesaron 25 g, los que fueron colocados en un recipiente apropiado. Se adicionaron 2,5 g de resina aniónica y 100 mL de solución reguladora de fosfato 0,1 mol L⁻¹ de pH 7,0. Se realizó un mezclado enérgico durante 2-3 min., manteniendo la temperatura entre 4-6 °C por medio de un termostato. La mezcla fue rápidamente filtrada con una tela de algodón y posteriormente centrifugada a 14.500 rpm durante 60 min. a una temperatura entre 4-6 °C. Finalmente, se separó el sobrenadante y se le agregó azida de sodio al 0,015 %. Los extractos obtenidos se almacenaron a 4 °C en el Laboratorio FIA y a -18 °C en el LAQA hasta el momento de ser utilizados como fuente enzimática en los procedimientos FIA y FB desarrollados, respectivamente. El esquema de la obtención de PFO se muestra en la [Figura 2.8](#).

2.3.3.2 Actividad Enzimática (AE) en el Extracto Crudo

La medición de la AE en los extractos crudos se llevo a cabo colocando en una serie de tubos de ensayo volúmenes de 0,04 hasta 0,20 mL del extracto obtenido. Luego, se adicionó a cada uno 2,80 mL de la solución de catecol 0,05 mol L⁻¹ y se completó hasta un volumen final de 5,0 mL con solución reguladora de fosfato de pH 7,0. La absorción de las *o*-quinonas formadas fue medida espectrofotométricamente a 410 nm, transcurrido un minuto de reacción, y a 25°C.

Una unidad de enzima PFO (UE) es definida como la cantidad de enzima que causa un incremento de 0,001 unidades de absorbancia por minuto en las condiciones descritas anteriormente^[48].

^[48] E.J. Lourenço, J.S. Leão, V.A. Neves, J. Sci. Food. 52 (1990) 249.

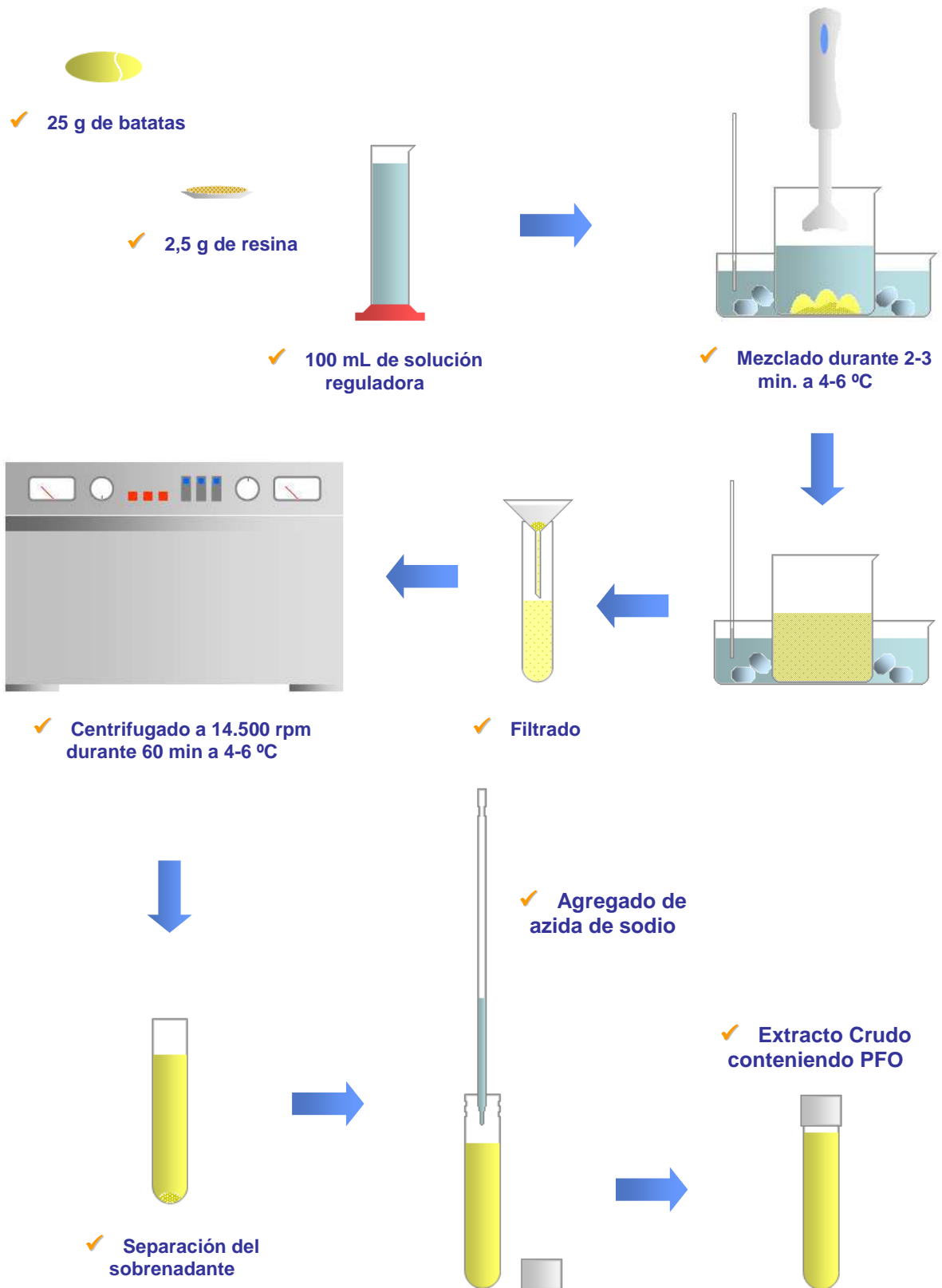


Figura 2.8. Procedimiento para la obtención de PFO a partir de batatas.

En la [Figura 2.9](#) se muestra un ejemplo de la curva de Absorbancia vs. mL de enzima que se obtuvo para calcular la AE del Extracto 1 obtenido en el Laboratorio FIA.

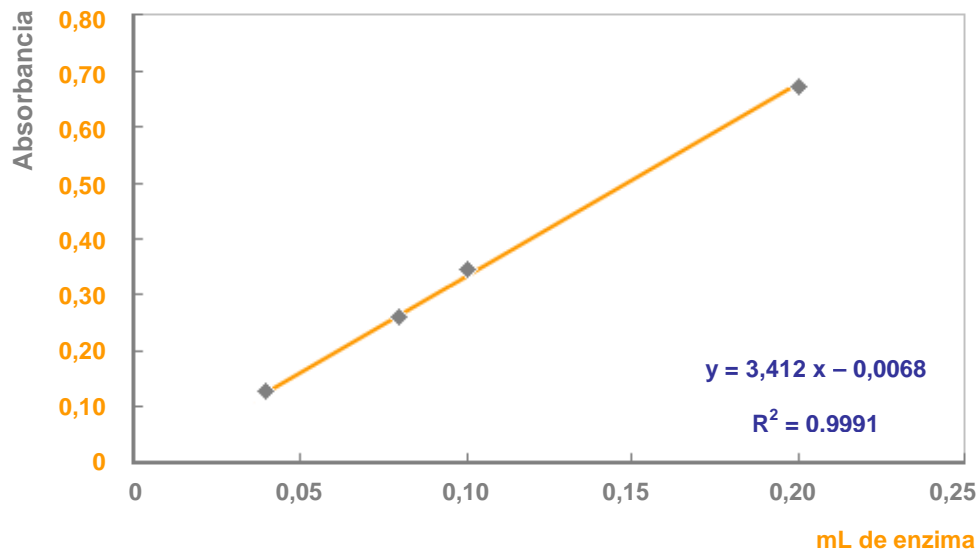


Figura 2.9. Curva de Absorbancia vs. mL de enzima para el cálculo de la AE en el Extracto 1 (Laboratorio FIA). A partir de la misma podemos obtener los mL de enzima que producen un aumento de 0,001 unidades de absorbancia. Estos mL corresponden por definición a 1 UE. Si se calcula $1/UE$ obtenemos la AE en UE/mL.

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1 Obtención del Extracto Crudo

Tanto el procedimiento de extracción como las condiciones del medio se establecieron de acuerdo a lo reportado en la literatura [42]. El pardeamiento enzimático en batatas [49] y la oxidación por el oxígeno atmosférico son los responsables de la disminución de la AE en el extracto crudo. Para minimizar estos efectos se pueden utilizar distintos agentes protectores y/o estabilizadores. En nuestro caso, se obtuvieron óptimos resultados con una resina de intercambio aniónico Dowex de 100-200 mesh.

En el Laboratorio FIA se obtuvieron cinco extractos enzimáticos en un período de seis meses. En el LAQA se obtuvieron cuatro extractos enzimáticos, en un período de dos meses. La [Tabla 2.2](#) muestra los valores de AE y la media con su correspondiente desviación estándar (SD). A pesar de que en ambos casos se llevó a cabo el mismo procedimiento, los valores de AE de los extractos en el LAQA fueron significativamente mayores que los correspondientes al Laboratorio FIA. Sin embargo, en un trabajo previo realizado por nuestro grupo en Argentina [47], sobre un total de cinco extractos, la media de AE obtenida y su desviación estándar fue de 5051 ± 816 UE/mL. Estas variaciones pueden asociarse al periodo estacional en el

[49] A.M. Mayer, E. Harel, *Phytochem.* 18 (1979) 193.

cual fueron llevadas a cabo las obtenciones. Tanto para este último trabajo citado como para los extractos del LAQA, las obtenciones se realizaron en el período primavera- verano. Por el contrario, en el caso de los extractos del Laboratorio FIA las obtenciones se realizaron en el período otoño-invierno. La cantidad de enzima contenida en el tejido puede variar en función de la temperatura ambiente, lo que justificaría las diferencias antes mencionadas.

A pesar de estas diferencias, tanto en el Laboratorio FIA como en el LAQA los resultados fueron satisfactorios y comparables con lo publicado en la literatura [42].

Tabla 2.2. AE de los distintos extractos obtenidos.

EXTRACTO	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (UE/mL)	
	Laboratorio FIA	LAQA
1	2814	4659
2	3412	4140
3	3185	4445
4	2688	4801
5	2886	--
Media	2997	4511
SD	295	287
RSD (%)	9,8	6,4
<i>t</i> calculado		3,48
<i>t</i> crítico ^a		2,36
<i>n</i>	5	4

SD: desviación estándar; RSD: desviación estándar relativa.

^a Valor de *t* tabulado para un límite de confianza del 95 % y 7 GL.

Otro parámetro a destacar es la reproducibilidad, evaluada a través de la

desviación estándar relativa (RSD). En ambos casos, los valores fueron menores al 10%, por lo que podemos decir que las obtenciones de los extractos proporcionaron valores aceptables en condiciones de reproducibilidad total.

Por todo lo expuesto, se puede concluir que las condiciones para la obtención del extracto crudo fueron satisfactorias tanto en el Laboratorio FIA como en el LAQA.

2.4.2 Tiempo de Conservación y Estabilidad del Extracto Crudo

Como se mencionó anteriormente, los extractos obtenidos en el Laboratorio FIA se almacenaron a 4 °C y los del LAQA a -18 °C. En el primer caso, la AE se mantuvo sin cambios significativos durante cuatro meses. En el LAQA sólo se obtuvieron registros durante cuatro semanas. En tal período no se observaron cambios significativos de la AE.

Por otro lado, la AE en las diluciones de los extractos utilizados en los procedimientos propuestos (Capítulo 3) permaneció sin cambios significativos luego de 2-3 h de trabajo a 25 °C, y se registraron disminuciones del orden del 10 % luego de 7-8 h de trabajo, a la misma temperatura.

El agregado de azida de sodio como agente antimicrobiano contribuyó a prolongar el tiempo de conservación de los extractos los cuales, por presentar una matriz de origen orgánico, son susceptibles a la acción de microorganismos.

2.5 CONCLUSIONES PARCIALES

Podemos concluir que es posible la obtención de un extracto crudo conteniendo PFO a partir de batatas (*Ipomoea batatas*). El tiempo que demanda el procedimiento es de sólo 2 h. El método es simple, reproducible y muy económico, lo que representa una ventaja valiosa para su aplicación en el desarrollo de métodos analíticos.

Capítulo 3



DETERMINACIÓN DE LEVODOPA Y

CARBIDOPA EN COMPRIMIDOS

3.1 OBJETIVO

3.2 INTRODUCCIÓN

3.3 - 3.5 PARTE A

3.6 - 3.8 PARTE B

3.9 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

En esta etapa de la tesis, el propósito es diseñar y optimizar dos sistemas automáticos para la determinación enzimática y simultánea de levodopa (LVD) y carbidopa (CBD) en preparaciones farmacéuticas:

- ✓ En una primera parte (Parte A) utilizando la metodología FIA con detección espectrofotométrica y aplicando sobre los datos espectrales Mínimos Cuadrados Parciales (PLS).
- ✓ En una segunda parte (Parte B) utilizando la metodología FB con igual detección y aplicando sobre los datos espectrales PLS y Regresión Lineal Múltiple (MLR) previa selección de variables mediante el Algoritmo de las Proyecciones Sucesivas (SPA).

Ambos métodos analíticos están basados en la oxidación de LVD y CBD catalizada por PFO.

3.2 INTRODUCCIÓN

Levodopa (ácido (*S*)-2-amino-3-(3,4-dihidroxifenil) propiónico) y carbidopa (ácido (*S*)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-hidrazino-2-metilpropiónico) son dos principios activos utilizados en conjunto para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Figura 3.1). La misma es un síndrome clínico que presenta cuatro características principales: bradicinecia (lentitud y pobreza de movimientos), rigidez muscular (resistencia de los músculos al movimiento pasivo), temblor en reposo y anomalías en la postura y la marcha.

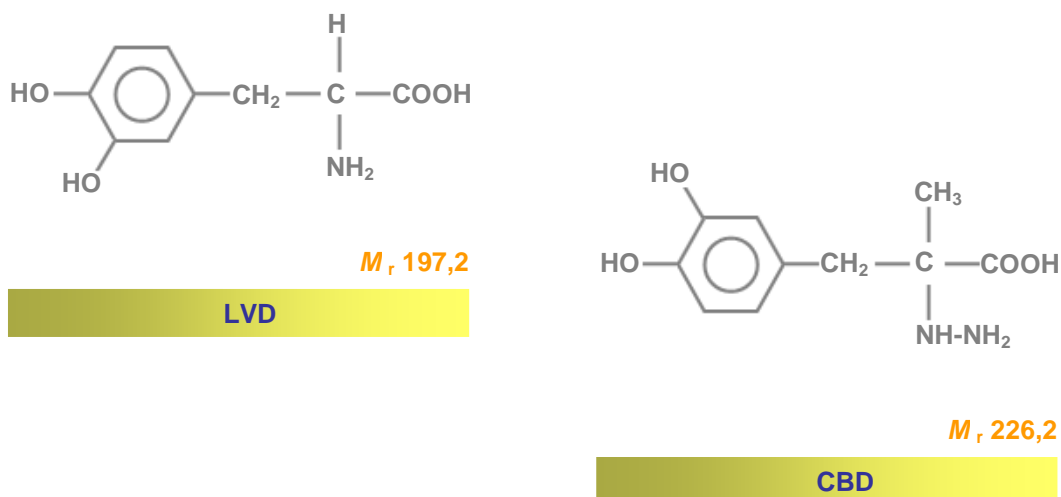


Figura 3.1. Estructura química y masa relativa (M_r) de los principios activos estudiados: levodopa (LVD) y carbidopa (CBD).

En esta enfermedad, los ganglios basales del encéfalo y, específicamente, el

sistema dopaminérgico nigroestriatal, constituyen el sitio de lesión fundamental. Existe una deficiencia pronunciada en la innervación dopaminérgica de los ganglios basales debido a la degeneración de las neuronas localizadas en la sustancia negra. Estas neuronas normalmente utilizan dopamina como neurotransmisor. Se ha demostrado que la pérdida de esta catecolamina por los ganglios basales subyace a todas las manifestaciones motoras principales del parkinsonismo.

Sin embargo, dado que la dopamina no atraviesa la barrera hematoencefálica, no tiene efectos terapéuticos en el tratamiento del parkinsonismo cuando se administra en forma sistémica. En su lugar, es utilizada la levodopa (LVD) la cual es un precursor inmediato de la dopamina. La LVD es transportada al encéfalo por el sistema transportador de grandes aminoácidos neutros y pasa al tejido estriatal donde es descarboxilada produciendo dopamina. Dado que alrededor del 95 % de la LVD administrada por vía oral es descarboxilada rápidamente en la periferia a dopamina, deben administrarse grandes dosis de la misma para permitir la acumulación suficiente de LVD en el encéfalo, donde su descarboxilación eleva la concentración central de dopamina. Esto resulta un inconveniente, ya que la mayoría de los pacientes con enfermedad de Parkinson tratados con dosis altas de LVD sufren efectos secundarios.

Por esta razón, la administración de LVD va acompañada de un inhibidor de la descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos. Esta combinación es el medio más efectivo para reducir los efectos secundarios extracerebrales de la LVD, ya que permite reducir la dosis administrada de la misma. La carbidopa (CBD) es uno de

estos inhibidores, y actúa disminuyendo la descarboxilación de LVD sólo en los tejidos periféricos, debido a que es incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica.

El restablecimiento de la transmisión dopaminérgica mediante la administración de LVD junto con carbidopa (CBD) restaura la función motora en el parkinsonismo y constituye la estrategia central en prácticamente todos los tratamientos de esta enfermedad [50].

La determinación cuantitativa de estos principios activos en preparaciones farmacéuticas comerciales resulta muy interesante dado que los mismos se encuentran juntos y en altas relaciones de concentración: 250/25, 200/50 y 100/25 mg de LVD/CBD, respectivamente. Los métodos oficiales, descritos en distintas farmacopeas internacionales, utilizan HPLC [7] [8]. Sin embargo, se han propuesto numerosos métodos alternativos, los cuales se llevan a cabo mediante técnicas como espectrofotometría UV-visible asistida por quimiometría [51] [52], voltamperometría [53] [54], potenciometría [55], electroforesis capilar [56] [57], resonancia

[50] A. Goodman-Gilman, T. Rall, A. Nier, P. Taylor, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Mc Graw-Hill, New York, 1996.

[51] P.C. Damiani, A.C. Moschetti, A.J. Rovetto, F. Benavente, A.C. Olivieri, *Anal. Chim. Acta* 543 (2005) 192.

[52] M. Chamsaz, A. Safavi, J. Fadaee, *Anal. Chim. Acta* 603 (2007) 140.

[53] M.S.M. Quintino, M. Yamashita, L. Angnes, *Electroanalysis* 18 (2006) 655.

[54] H.C. de Melo, A.P.D. Selegim, W.L. Polito, O. Fatibello-Filho, I. da Cruz Vieira, *J. Braz. Chem. Soc.* 18 (2007) 797.

[55] S.S. Badawy, Y.M. Issa, A.S. Tag-Eldin, *Electroanalysis* 8 (1996) 1060.

[56] S. Fanali, V. Pucci, C. Sabbioni, M.A. Raggi, *Electrophoresis* 21 (2000) 2432.

[57] L. Zhang, G. Chen, Q. Hu, Y.Z. Fang, *Anal. Chim. Acta* 431 (2001) 287.

magnética nuclear ^1H [58], espectrometría IR empleando técnicas quimiométricas [59] y fluorescencia sincrónica [60].

También, dado que tanto LVD como CBD son sustratos de la enzima PFO, se ha propuesto un método enzimático con detección espectrofotométrica utilizando análisis por inyección en flujo y regresión lineal univariada [26]. Sin embargo, en este trabajo no queda claro como se resuelve la superposición espectral generada cuando la enzima reacciona con una mezcla de LVD y CBD. Es por ello que se decidió aplicar técnicas de calibración multivariada, ya que las mismas son de gran utilidad para resolver este tipo de problemas.

3.2.1 Calibración Multivariada

Históricamente, las técnicas multivariadas han sido aplicadas en ciencias biológicas y ciencias del comportamiento. Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado el interés de las mismas, dando lugar a aplicaciones en otros campos de la investigación como química, física, geología, ingeniería, entre otros.

En Química Analítica, actualmente, la mayor parte del análisis cuantitativo de sistemas de multicomponentes con datos de origen espectrofotométrico se realiza utilizando técnicas de calibración multivariada, pues estas, generalmente, permiten resolver problemas tales como presencia de interferentes, solapamiento espectral u

[58] Z. Talebpour, S. Haghgoo, M. Shamsipur, *Analytica Chimica Acta* 506 (2004) 97.

[59] M. Khanmohammadi, E. Mobedi, A.B. Garmarudi, H. Mobedi, K. Kargosha, *Pharm. Dev. Tech.* 12 (2007) 573.

[60] W.H. Kim, M.M. Karim, S.H. Lee, *Anal. Chim. Acta* 619 (2008) 2.

otros efectos de la matriz de la muestra, sin pasos previos de separación. La *calibración multivariada* puede definirse como un conjunto de técnicas que tienen por objetivo la cuantificación de uno o más analitos en una mezcla incógnita de multicomponentes. La determinación se realiza mediante el empleo de datos instrumentales medidos, utilizando más de una variable. Un ejemplo clásico de datos multivariados es un espectro de absorción molecular, donde la señal instrumental es la absorbancia, y las variables las longitudes de onda. Análogamente, pueden ser utilizados espectros de fluorescencia molecular, absorción en el infrarrojo y datos no espectroscópicos como voltamperogramas. A su vez, estos datos pueden ser de primer orden, en el caso de obtener un vector de datos por cada muestra (por ejemplo, espectro de absorbancia), o de orden superior, lo que sería una matriz de datos por muestra (por ejemplo, espectros de absorbancia en función del tiempo).

La calibración multivariada presenta importantes ventajas respecto de los métodos univariados:

- ✓ Permite analizar más de un componente de manera simultánea. Esto reduce significativamente el tiempo invertido en el desarrollo de métodos.
- ✓ Mejora la calidad de los resultados debido a una mayor disponibilidad de información.
- ✓ Permite la cuantificación en presencia de interferentes, ahorrando de esta forma tiempo y esfuerzos. Por ejemplo, en calibración univariada puede realizarse la determinación cuantitativa de un componente en presencia de

interferentes, separando físicamente el analito de interés de todos los interferentes, o bien seleccionando las variables apropiadas.

✓ Uno de los aportes más importantes de la calibración multivariada es la resolución de problemas paradigmáticos. Un ejemplo es su aplicación en la espectroscopia en el infrarrojo cercano (NIR) para el análisis cuantitativo, que no era considerado por los espectroscopistas debido al gran solapamiento de las señales, lo que dificultaba la asignación de bandas a especies químicas específicas.

Sin embargo, en calibración multivariada, los datos espectrales utilizados son intrínsecamente poco selectivos, por lo que son necesarios procedimientos que distingan, de algún modo, las señales que le corresponden a cada analito de interés.

En la [Figura 3.2](#) se detallan las técnicas de calibración multivariada más conocidas y se sugieren criterios para una apropiada selección de las mismas. Como puede observarse, hay dos ramas principales: Mínimos Cuadrados Clásicos (CLS) y Mínimos Cuadrados Inversos (ILS).

CLS se aplica cuando se conocen las concentraciones de todos los analitos y pueden obtenerse los espectros puros de los mismos directa o indirectamente. En CLS la calibración implica la medida de espectros de muestras de calibración (r), conteniendo analitos con concentraciones conocidas (c), y la obtención de la matriz de sensibilidades (S) a partir de la Ley de Beer escrita de forma directa, por ajuste mediante mínimos cuadrados:

$$r = c \cdot S$$

Ecuación 3.1

En general, CLS puede aplicarse a sistemas que presentan un bajo número de componentes, pocas variables que afectan la respuesta instrumental o la concentración de los analitos de interés, y no presentan interferencias significativas.

Cuando el sistema es complejo, puede utilizarse un método de calibración inversa, con el cual no es necesario obtener los espectros de los analitos puros. Los métodos de calibración inversa reciben este nombre porque se basan en la Ley de Beer escrita en forma inversa:

$$c = R \cdot b$$

Ecuación 3.2

En este caso, se supone la existencia de una proporcionalidad entre la concentración de los componentes a calibrar (c) y la correspondiente respuesta, a través de coeficientes de regresión que se calculan mediante un modelo apropiado. De esta forma, se pueden estudiar mezclas de componentes en las que son de interés uno o más analitos, pero pueden desconocerse concentraciones, espectros e identidades químicas de los restantes componentes. Por lo tanto, los métodos inversos permiten superar una de las grandes desventajas de CLS: la necesidad del conocimiento de las concentraciones de todos los componentes presentes en las mezclas de calibrado.

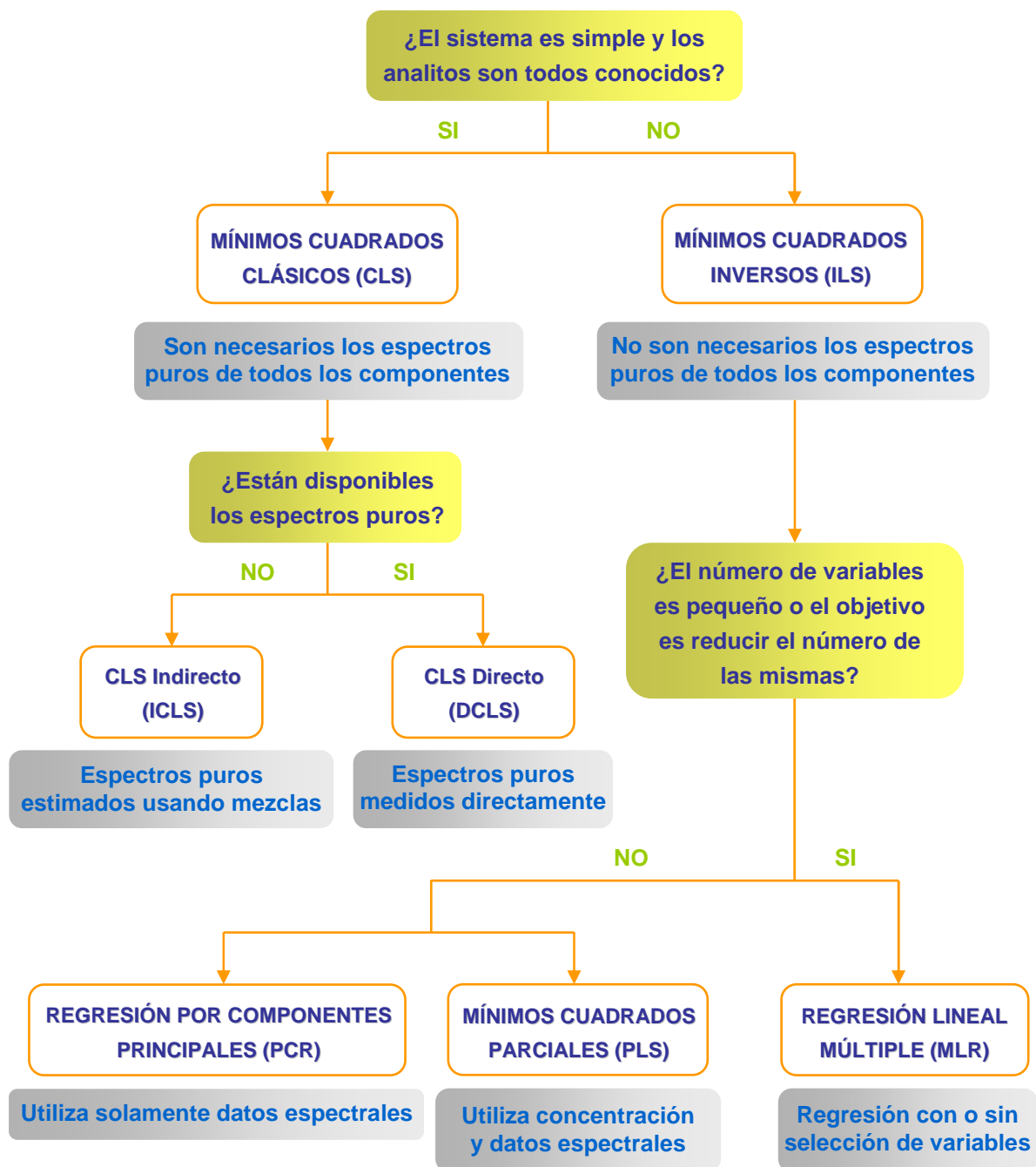


Figura 3.2. Guía para la selección de una técnica de calibración multivariada. Modificado de ^[61].

^[61] K.R. Beebe, R.J. Pell, M.R. Seasholtz, Chemometrics: A practical guide, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1998.

Los métodos ILS permiten predecir la concentración de uno o más componentes en presencia de fuentes de variación físicas y químicas, por ejemplo, interferentes. Los requerimientos son que el sistema de medición pueda diferenciar adecuadamente el componente de interés de otras fuentes de variación, que la respuesta instrumental sea suficientemente lineal con la concentración y que los experimentos de calibración sean cuidadosamente planificados.

Los tres métodos ILS más importantes son: Regresión Lineal Múltiple (MLR), Regresión por Componentes Principales (PCR) y Mínimos Cuadrados Parciales (PLS). Como lo indica la [Figura 3.2](#), MLR es apropiado cuando el número de variables es pequeño o en situaciones donde se pueda realizar una selección de las mismas. Por el contrario, PCR y PLS pueden ser utilizados sin una selección explícita de variables. En estos, las variables medidas (por ejemplo, valores de absorbancia a varias longitudes de onda) son transformadas, por medio de un algoritmo iterativo cíclico, a nuevas variables denominadas *factores*. La diferencia fundamental entre ambos métodos es que en PCR los factores describen únicamente la máxima varianza posible en la matriz de los datos instrumentales, mientras que en PLS, los factores describen la máxima correlación posible entre la matriz de datos instrumentales y el vector de concentraciones del/los analito/s de interés. Esto es, en PCR los factores son independientes de la concentración, mientras que en PLS se emplean factores dependientes de la concentración ^[61] ^[62].

En esta parte de la tesis, en primer lugar se aplicó *PLS-1* a los datos espectrales

^[62] Tópicos de Quimiometría I, Asociación Argentina de Química Analítica (AAQA), 2005. Página oficial AAQA: www.aaqa.org.ar

obtenidos luego de la reacción de oxidación de LVD y CBD catalizada con PFO (Parte A). Posteriormente, a otro conjunto de datos se aplicó MLR previa selección de variables utilizando el *Algoritmo de las Proyecciones Sucesivas* (Parte B).

3.2.1.1 Mínimos Cuadrados Parciales (PLS)

PLS es el método de calibración multivariada más empleado cuando la información instrumental proveniente de cada muestra es de tipo vectorial (un ejemplo clásico es un espectro de absorbancia). En este sentido, su desarrollo ha superado de algún modo a PCR, ya que incorpora información útil referida a las concentraciones de las mezclas de calibrado durante la etapa de cálculo de los factores.

Por otro lado, existen dos variantes de PLS: la primera denominada PLS-1, que concentra su atención en un único analito a la vez, y la segunda, PLS-2, que permite calibrar y predecir las concentraciones de varios analitos simultáneamente. Si bien PLS-1 debe repetirse para cada analito de interés, permite optimizar las condiciones de trabajo para cada analito de manera independiente, lo que resulta una gran ventaja. Actualmente, se prefiere utilizar PLS-1 en la mayoría de las aplicaciones.

El modelo PLS involucra dos etapas ^[63]:

- ✓ *Calibración.* Establece la relación matemática entre los espectros y las concentraciones de los componentes de referencia, a partir de un conjunto de soluciones estándares.

^[63] H. Martens, T. Naes, *Multivariate Calibrations*, Wiley, Chichester, 1998.

✓ *Predicción.* Se emplean los resultados de la calibración para estimar las concentraciones de los analitos en las muestras incógnitas.

En la etapa de calibración se estima el número óptimo de factores A , lo que usualmente se lleva a cabo mediante la técnica de validación cruzada y aplicando el criterio de Haaland y Thomas ^[64]. El resultado de la calibración es la obtención del vector de coeficientes de regresión, cuyos elementos se obtienen en cada uno de los A pasos del algoritmo iterativo cíclico aplicado. En la etapa de predicción se emplean los coeficientes de regresión para estimar la concentración del analito en la/las muestra/s incógnita/s.

El modelo PLS-1 es ampliamente conocido. Detalles del algoritmo iterativo y de su implementación pueden encontrarse en la literatura ^[65].

3.2.1.2 MLR con Selección de Variables

Una ventaja importante de MLR es su capacidad de generar modelos mas simples y fáciles de interpretar que PCR y PLS, ya que en estas técnicas de calibración la regresión se basa en variables latentes (factores), que no tienen un significado físico. Como hemos mencionado, es apropiado utilizar MLR cuando el número de variables es pequeño o en situaciones donde se imponga una selección explícita de las mismas. En este sentido, la selección de variables es un paso crítico

^[64] D. Haaland, E. Thomas, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1193.

^[65] R.G. Brereton, *Chemometrics. Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*, Wiley, Chichester, 2003.

en MLR. El modelo debe incluir una única variable por cada fuente de varianza presente en los datos, que además debe estar correlacionada con la respuesta. Si no se tienen en cuenta todas las fuentes de varianza significativas que influyen sobre la respuesta se obtienen modelos subajustados, que se caracterizan por realizar predicciones afectadas de error sistemático. Por el contrario, si el modelo tiene más parámetros que los estrictamente necesarios para representar todas las fuentes de varianza relevantes correlacionadas con la respuesta se dice que está sobreajustado. Las predicciones realizadas con un modelo sobreajustado tienen límites de confianza excesivamente grandes como consecuencia de que el modelo incluye vectores que aportan información redundante o sólo ruido, lo que incrementa la incertidumbre de las predicciones. Por otro lado, el subconjunto de variables seleccionadas debe contener como mínimo tantas variables como componentes químicos tiene el sistema [66].

El desarrollo de procedimientos matemáticos que permitan la selección de variables espectrales continúa siendo un desafío, especialmente cuando un espectro exhibe un gran solapamiento y las diferencias son imperceptibles, como suele suceder en el caso de la espectrofotometría UV-visible. Para resolver este problema se han propuesto varios métodos de selección de variables, tales como: introducción de ruido artificial en PLS [67], análisis lineal híbrido [68], redes neuronales

[66] G.R. Ramos, M.C.G. Alvarez-Coque, *Quimiometría, Síntesis*, Madrid, 2001.

[67] V. Centner, D.L. Massart, O.E. de Noord, S. Jong, B.M. Vandeginste, C. Sterna, *Anal. Chem.* **68** (1996) 3851.

[68] H.C. Goicoechea, A.C. Olivieri *Analyst* **124** (1999) 725.

artificiales [69] [70], transformación wavelet [71] [72], PLS discriminante [73] y el muy utilizado algoritmo genético [74] [75] [76] [77]. Por otro lado, Araújo y col. propusieron en 2001 una novedosa estrategia de selección de variables para calibración multivariada: el *Algoritmo de las Proyecciones Sucesivas* [78], el cual desde entonces ha sido utilizado en numerosas aplicaciones [79] [80] [81].

3.2.1.2.1 Algoritmo de las Proyecciones Sucesivas (SPA)

SPA es un algoritmo iterativo que emplea operaciones vectoriales simples para obtener un subconjunto de variables en las cuales el contenido de información es mínimamente redundante, lo que evita problemas de sobreajuste. Si aplicamos el procedimiento a una matriz de datos espectrales $X_{cal} = M_{cal} \times J$, en donde M_{cal} son

[69] F. Despagne, D.L. Massart, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 40 (1998) 145.

[70] R. Todeschini, D. Galvani, J.L. Vilchez, M. del Olmo, N. Navas, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 93.

[71] B.K. Alsberg, A.M. Woodward, M.K. Winson, J.J. Rowl, D.B. Kell, *Anal. Chim. Acta* 368 (1998) 29.

[72] D.J. Rimbaud, B. Walczack, R.J. Poppi, O.E. de Noord, D.L. Massart, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4317.

[73] B.K. Alsberg, D.B. Kell, R. Goodacre, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4126.

[74] C.B. Lacasius, M.L.M. Beckers, G. Kateman, *Anal. Chim. Acta* 286 (1994) 135.

[75] R. Leardi, *J. Chemom.* 8 (1994) 65.

[76] D.J. Rimbaud, D.L. Massart, R. Leardi, O.E. de Noord, *Anal. Chem.* 67 (1995) 4295.

[77] R. Leardi, R. Boggia, M. Terrile, *J. Chemom.* 6 (1992) 267.

[78] M.C.U. Araújo, T.C.B. Saldanha, R.K.H. Galvão, T. Yoneyama, H.C. Chame, V. Visani, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 57 (2001) 65.

[79] R.K.H. Galvão, M.F. Pimentel, M.C.U. Araújo, T. Yoneyama, V. Visani, *Anal. Chim. Acta*, 443 (2001) 107.

[80] M. Coelho Pontes, R.K.H. Galvão, M.C.U. Araújo, P.M.T. Moreira, O.D. Pessoa Neto, G.E. José, T.C.B. Saldanha, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 78 (2005) 11.

[81] F.F. Gambarra-Neto, G. Marino, M.C.U. Araújo, R.K.H. Galvão, M. Coelho Pontes, E.P. Mederos, R.S. Lima, *Talanta* 77 (2009) 1660.

las mezclas de calibración y J las longitudes de onda, SPA comienza con un vector de inicio x_0 (en este caso una longitud de onda) y calcula cual de los vectores restantes tiene la mayor proyección sobre el plano S_0 ortogonal a x_0 . Este vector, que denominaremos x_1 , puede considerarse que contiene la mayor cantidad de información no incluida en x_0 (Figura 3.3). En la siguiente iteración, SPA restringe el análisis al plano S_0 , tomando a x_1 como un nuevo vector de referencia y procediendo de la manera anteriormente descrita. De esta forma, se incorpora una nueva variable en cada iteración hasta alcanzar un determinado número N de longitudes de onda. El mejor vector de inicio y el criterio de parada (número de variables a seleccionar) se pueden optimizar de manera tal de obtener un modelo con la máxima capacidad predictiva.

Una restricción de este algoritmo es el número de variables (longitudes de onda) que pueden ser seleccionadas, ya que este no puede ser mayor que el número de mezclas de calibración. Sin embargo, esto no representa una desventaja ya que si son necesarias muchas variables espectrales para discriminar los analitos, se requerirá un gran número de mezclas para llevar a cabo la calibración.

Sobre cada conjunto de vectores (variables) seleccionados por las proyecciones, se realiza un modelo de calibración utilizando MLR. Una vez establecido el modelo se predicen las concentraciones de un conjunto de validación y se calcula la raíz cuadrada del error cuadrático medio de predicción (RMSEP). El conjunto de variables seleccionadas es el que tiene el menor RMSEP. Los detalles del procedimiento matemático de este algoritmo pueden encontrarse en [78].

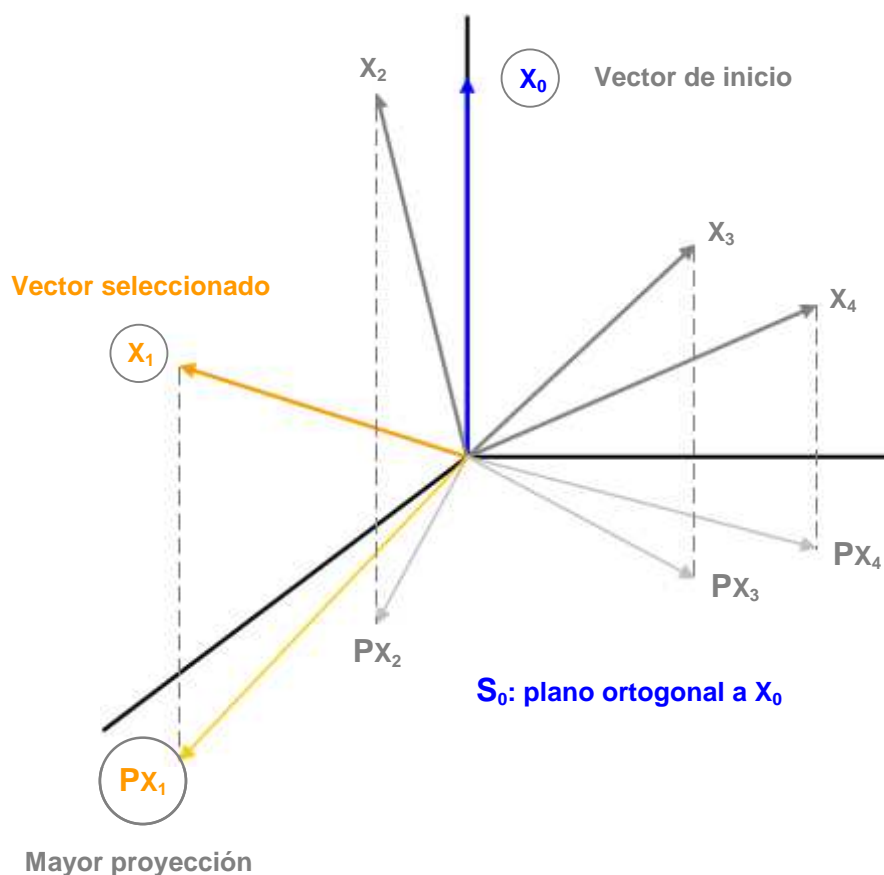


Figura 3.3. Ejemplo de SPA con $J = 5$, $M_{\text{cal}} = 3$ y $k(0) = 0$. Resultado de la primer iteración: $k(1) = 1$. J representa los vectores columnas, por ejemplo, longitudes de onda. $k(n)$ es el vector seleccionado en la iteración n . M_{cal} son las mezclas de calibración.

Por otro lado, un aspecto muy importante a destacar es que para la aplicación de un modelo de calibración multivariada se debe establecer previamente el número de mezclas de patrones que contienen los analitos a determinar. Si bien este número debe ser como mínimo igual al número de analitos, se prefiere utilizar un conjunto de calibración con un número de mezclas mayor al número de analitos, debido a que de este modo se obtienen resultados más precisos. A su vez, esto plantea el

problema de saber cuales son las concentraciones de las mezclas de calibrado, problema que puede resolverse por medio del *Diseño Experimental*.

3.2.2 Diseño Experimental

El diseño experimental propone por un camino eficiente, obtener la optimización de un proceso o producto con un mínimo de experimentos. Un método analítico es en sí mismo un procedimiento o proceso. En los mismos intervienen un número considerable de variables (concentraciones de reactivos, parámetros instrumentales, pH, tiempos de reacción, etc.) y todas ellas deben ser ajustadas para obtener una óptima respuesta (máxima intensidad de señal, óptima separación de picos, mínimo error relativo, etc.). Por lo tanto, el diseño de experimentos es una técnica orientada a problemas multivariantes, e involucra dos contextos ^[61]:

- ✓ Describir la serie de experimentos que será llevada a cabo con la intención de desarrollar un modelo; por ejemplo, un modelo de regresión.
- ✓ La optimización de procesos o productos para determinar las condiciones que son requeridas para obtener un resultado con características deseables u óptimas.

En esta tesis, se utilizaron métodos de diseño experimental en ambos contextos. Particularmente, en esta parte del trabajo, se empleó un *Diseño Central Compuesto (DCC)* para calcular el número de experimentos que deben realizarse para aplicar las técnicas de *Mínimos Cuadrados Parciales (PLS)* y el *Algoritmo de las*

Proyecciones Sucesivas con Regresión Lineal Múltiple (MLR-SPA). En un diseño de este tipo, el número de mezclas a preparar queda definido por:

$$N = 2^n + 2n + c \quad \text{Ecuación 3.3}$$

donde N es el número de mezclas, n el número de analitos y c el número de puntos centrales. En la [Figura 3.4](#) se representa un DCC para dos analitos.

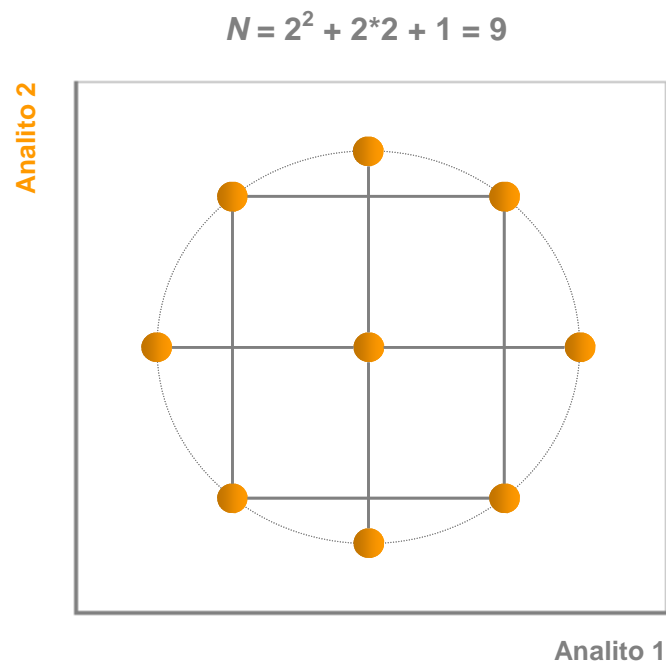


Figura 3.4. Diseño experimental Central Compuesto para dos componentes. N : número de mezclas.

Como puede observarse, se precisan nueve experimentos que incluyen cinco niveles de concentración para cada analito en estudio, lo que representa una

ventaja importante respecto de otros diseños, como por ejemplo Factorial Completo.

En el próximo capítulo, se continúa con la teoría de Diseño Experimental debido a que la misma se utiliza para optimizar las variables químicas involucradas en el trabajo desarrollado (Ver Capítulo 4, sección 4.2.2).

Parte A



DETERMINACIÓN DE LVD Y CBD

UTILIZANDO UN SISTEMA FIA Y PLS-1

3.3 PARTE EXPERIMENTAL

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5 CONCLUSIONES PARCIALES

3.3 PARTE EXPERIMENTAL

3.3.1 Equipamiento y Programas Quimiométricos

- ✓ Espectrofotómetro UV-visible con arreglo de diodos Hewlett Packard modelo 8452 A.
- ✓ pHmetro Orion modelo 710 A.
- ✓ Celda de flujo Hellma con un volumen interno de 18 μL .
- ✓ Bomba peristáltica Gilson modelo Minipuls 3.
- ✓ Válvula Rheodyne modelo 5041.
- ✓ Reactor, bucle de inyección y tubos de línea de Teflon[®] de 0,5 mm de diámetro interno y tubos de bomba de Tygon[®].
- ✓ Programa quimiométrico Unscrambler[®] versión 9.1.

3.3.2 Reactivos y Soluciones

Todas las soluciones se prepararon con agua ultra pura (18 m Ω) y todos los reactivos químicos que se utilizaron fueron de grado analítico.

- ✓ Solución reguladora de fosfato 0,1 mol L⁻¹ de pH 7,0.
- ✓ Soluciones patrón de LVD (Saporiti) y CBD (Saporiti) de 0,800 mg mL⁻¹ y 0,400 mg mL⁻¹, respectivamente. Las mismas se prepararon en solución reguladora de fosfato de pH 7,0. Posteriormente, se protegieron de la luz y

almacenaron a 4 °C. Las soluciones testigo fueron preparadas por dilución apropiada de la solución patrón con solución reguladora.

- ✓ Extracto crudo conteniendo PFO. A partir del mismo se prepararon las soluciones de trabajo por dilución apropiada con solución reguladora. Estas soluciones se conservaron a 4 °C hasta el momento de su utilización.
- ✓ Muestras de Lebocar® (Pfizer) en dos presentaciones: 250/25 (A) y 100/25 (B) mg de LVD/CBD, respectivamente.
- ✓ Solución conteniendo excipientes: celulosa microcristalina, almidón de maíz, estearato de magnesio y sílica coloidal (Saporiti), en cantidades similares a las presentes en las preparaciones farmacéuticas analizadas.

3.3.3 Metodología Analítica

3.3.3.1 Preparación de los Conjuntos de Calibración y Validación

Con el propósito de obtener un modelo de regresión para cada analito en estudio, se realizó un diseño experimental central compuesto. El conjunto de calibración estuvo conformado por nueve mezclas, con tres repeticiones del punto central. Los intervalos de concentración estuvieron comprendidos entre 0,097 y 0,550 mg mL⁻¹ para LVD y entre 0,020 y 0,101 mg mL⁻¹ para CBD (Figura 3.5). Los mismos fueron seleccionados teniendo en cuenta la relación LVD/CBD presente en las preparaciones comerciales analizadas (4/1 a 10/1).

Para evaluar la capacidad predictiva de los modelos de calibración, se preparó un conjunto de validación formado por ocho mezclas, cuyas concentraciones

estuvieron comprendidas dentro de los intervalos correspondientes a las mezclas de calibración.

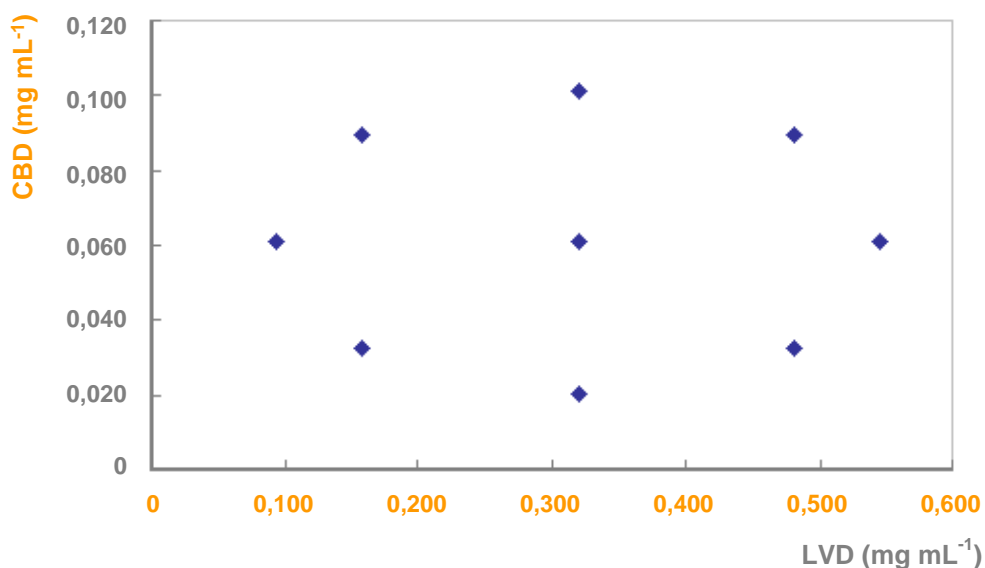


Figura 3.5. Concentraciones de las mezclas correspondientes al conjunto de calibración.

3.3.3.2 Preparación de las Muestras

Las preparaciones farmacéuticas analizadas se expenden en forma de comprimidos. En la presentación A, cada comprimido pesa alrededor de 400 mg y en la presentación B, alrededor de 230 mg. Se pesaron 10 comprimidos de cada presentación los cuales se pulverizaron y homogeneizaron. Del polvo obtenido se pesaron 67 mg y se disolvieron en 100 mL de solución reguladora de fosfato de pH 7,0. Finalmente, la solución se filtró en línea por medio de un filtro tubular de algodón (FA) incorporado al sistema FIA (Figura 3.6).

Por otro lado, con el objetivo de validar el método propuesto, se realizó un estudio de recuperación. Para ello, se adicionaron a las muestras analizadas diferentes cantidades conocidas de LVD y CBD.

3.3.3.3 Sistema FIA y Procedimiento Desarrollado

En la [Figura 3.6](#) se puede observar el sistema FIA propuesto. Este sistema, con detección espectrofotométrica, se desarrolló en las modalidades reversa y flujo detenido. Por esa razón, se inyectó un volumen de 100 μL de una dilución del extracto enzimático (equivalente a 230 UE) en una corriente de solución reguladora de fosfato 0,1 mol L^{-1} de pH 7,0 (C1). El caudal de esta última (q_1) fue de 1,1 mL min^{-1} . La muestra fluyó continuamente por el canal C2 con un caudal (q_2) de 1,1 mL min^{-1} , y fue filtrada en línea por medio de un filtro tubular de algodón (FA).

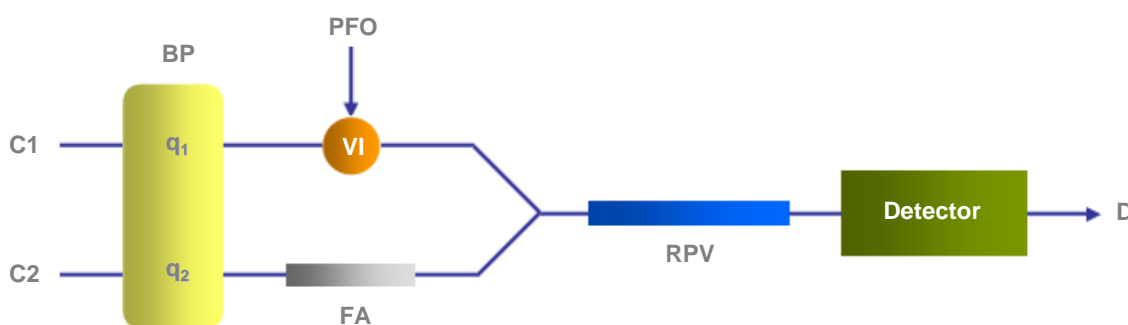


Figura 3.6. Sistema FIA propuesto para la determinación simultánea de LVD y CBD. C1: solución reguladora fluyendo a un caudal q_1 ; C2: muestra fluyendo a un caudal q_2 ; PFO: polifenol oxidasa; BP: bomba peristáltica; VI: válvula de inyección; FA: filtro de algodón; RPV: reactor con perlas de vidrio; D: desecho.

Tanto C1 como C2, confluyeron en un reactor relleno con perlas de vidrio (RPV) de 100 mm de longitud. Una vez que el bolo de reacción llegó a la celda, se detuvo el flujo. El tiempo que tarda en llegar la muestra a la celda fue de 40 s y el tiempo que el flujo estuvo detenido 120 s. Cumplido este tiempo, se registró el espectro y el flujo fue restaurado. La línea de base se obtuvo siguiendo el mismo procedimiento pero reemplazando en el canal C2 la muestra por solución reguladora.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1 Optimización de Variables Químicas y Parámetros FIA

La AE se optimizó en función de los parámetros estadísticos obtenidos cuando se aplicó PLS-1 a los datos espectrales correspondientes a los conjuntos de calibración y validación. Se estudió el intervalo entre 150-300 UE, siendo el valor óptimo 230 UE. En el caso del medio de reacción y de disolución de las soluciones estándares y de la muestra, se consideró apropiado utilizar una solución reguladora de fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ debido a que, como se mencionó anteriormente (sección 2.2.3.1), es el medio óptimo de reacción para la PFO.

Los parámetros del sistema FIA se optimizaron por el método univariado. El criterio utilizado fue un compromiso entre sensibilidad y reproducibilidad de la señal analítica. En la [Tabla 3.1](#) se muestran los intervalos estudiados y los valores óptimos seleccionados.

Tabla 3.1. Optimización de los parámetros FIA.

PARÁMETRO FIA	INTERVALO ESTUDIADO	VALOR ÓPTIMO
Caudal (mL min^{-1})	0,8-2,2	1,1
Volumen Inyectado (μL)	50-300	100
Longitud del Reactor (mm)	100-1000	120
Tiempo Transcurrido hasta Detener el Flujo (s)	30-60	40

El tipo y longitud del reactor resultaron apropiados para conseguir un óptimo contacto enzima (PFO)-sustratos (LVD/CBD).

3.4.2 Selección de Regiones Espectrales

La enzima PFO cataliza la oxidación de LVD y CBD. Esta oxidación genera α -quinonas que tienen una fuerte absorción en la región UV-visible. A pesar de que ambos compuestos tienen estructuras similares ([Figura 3.1](#)), se obtienen distintos productos de reacción. En la [Figura 3.7a](#) se muestran los espectros puros generados cuando soluciones de LVD y CBD se oxidaron en presencia de PFO. Como puede observarse, hay una fuerte absorción alrededor de 480 nm para LVD y de 360 nm para CBD. Así mismo, puede apreciarse un importante solapamiento espectral a lo largo de toda la región analizada. La [Figura 3.7b](#) muestra el espectro de una mezcla de LVD y CBD luego de su oxidación en presencia de PFO.

La determinación de ambos analitos en mezclas por un método tradicional, como calibración univariada, requeriría la aplicación de una técnica previa de separación. Para evitar esto, y debido a la existencia de diferencias espectrales importantes, se optó por la utilización de técnicas de calibración multivariada. En esta parte del trabajo, se aplicó Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) en su modalidad PLS-1.

Para la selección de la región espectral óptima para cada analito, en primer lugar, se realizó una inspección visual de los espectros correspondientes a los conjuntos de calibración y validación. En base a esto, se preseleccionaron distintas regiones las cuales incluían los máximos de absorción señalados en la [Figura 3.7a](#).

A las regiones preseleccionadas se les aplicó PLS-1 y, en base a los parámetros estadísticos obtenidos, se eligió la región espectral óptima la cual resultó ser, para ambos analitos, la comprendida entre 290 y 540 nm.

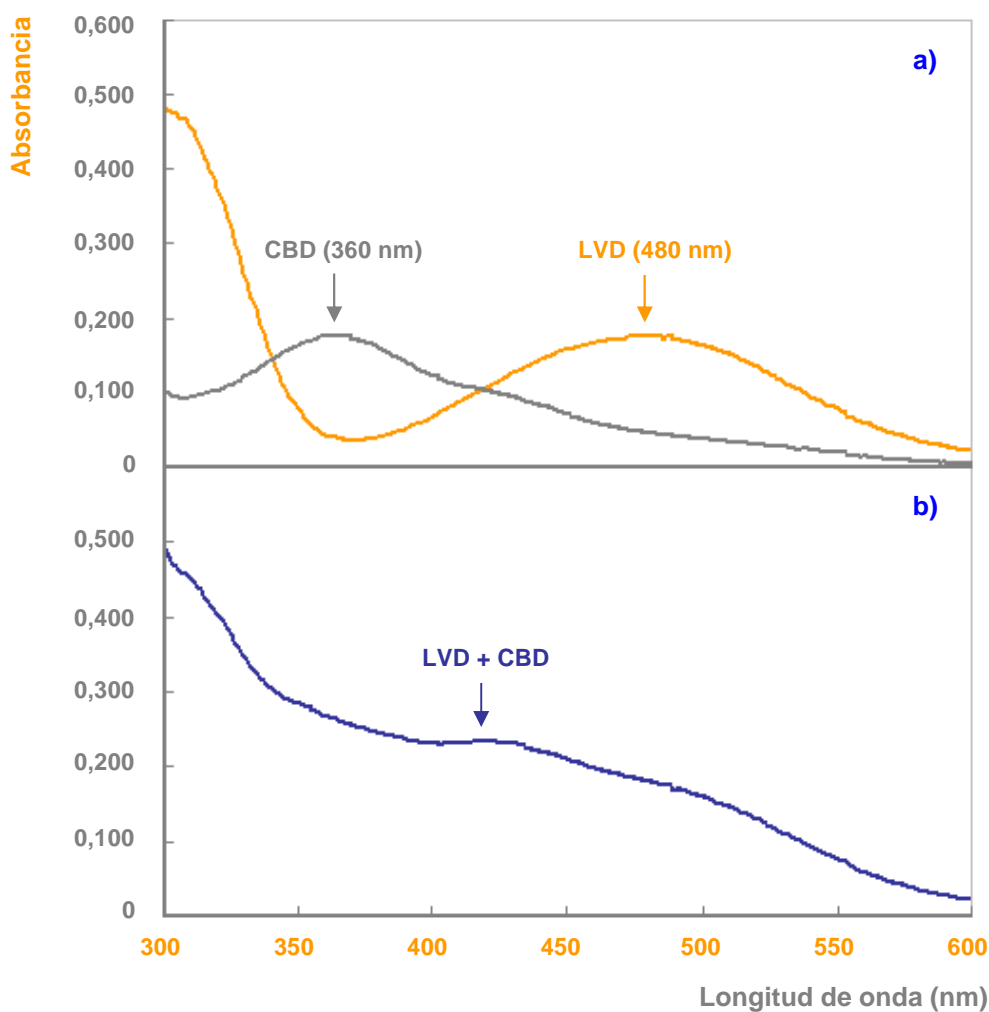


Figura 3.7. a) Espectros correspondientes a una solución de LVD ($0,323 \text{ mg mL}^{-1}$) y una solución de CBD ($0,061 \text{ mg mL}^{-1}$) luego de su oxidación en presencia de PFO. En ambos casos se señalan máximos de absorción. **b)** Espectro de una mezcla de LVD y CBD ($0,323$ y $0,061 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente) luego de la reacción de oxidación catalizada por PFO.

Teniendo en cuenta que las medidas fueron tomadas cada 2 nm, cada región

espectral estuvo conformada por un total de 126 variables.

3.4.3 Optimización del Tiempo de Reacción

La optimización del tiempo que se detiene el flujo implica el tiempo en que se permite desarrollar la reacción de oxidación de LVD y CBD, en presencia de PFO. Para optimizar dicho tiempo se hicieron reaccionar 230 UE de PFO, en medio de solución reguladora de fosfato (pH 7,0) con las diferentes mezclas correspondientes a los conjuntos de calibración y validación. Cada vez que el bolo de reacción llegó a la celda se detuvo el flujo durante distintos tiempos, dentro de un intervalo de 60 hasta 300 s, y se registraron los espectros correspondientes (Figura 3.8).

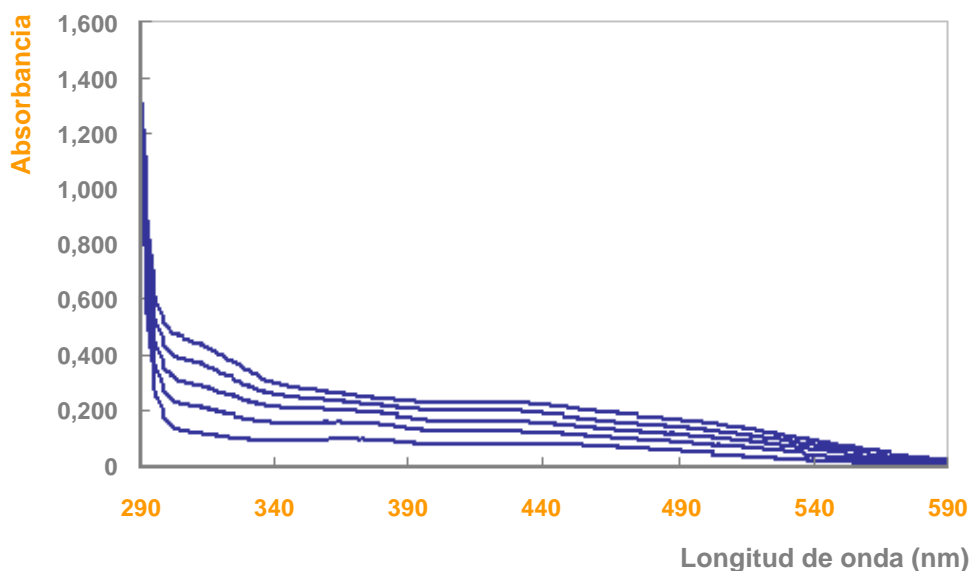


Figura 3.8. Espectros correspondientes a una mezcla del conjunto de calibración (0,323 y 0,061 mg mL⁻¹ de LVD y CBD, respectivamente) registrados en función del tiempo. Desde abajo hacia arriba: 60, 120, 180, 240 y 300 s.

Una vez más, el criterio para determinar el tiempo óptimo de reacción se estableció en función de los parámetros estadísticos obtenidos cuando se aplicó el algoritmo PLS-1 a los datos espectrales correspondientes a los conjuntos de calibración y validación para cada tiempo estudiado. En base a esto, el tiempo óptimo del flujo detenido en la celda fue 120 s. Teniendo en cuenta que el tiempo transcurrido hasta detener el flujo fue de 40 s, el tiempo óptimo de reacción fue 160 s.

3.4.4 Estudio de Interferentes

Un problema frecuente en el análisis de medicamentos es la presencia de excipientes. Para evaluar el comportamiento espectral de los mismos se preparó una solución conteniendo celulosa microcristalina, almidón de maíz, estearato de magnesio y sílica coloidal, en cantidades similares a las presentes en las preparaciones comerciales analizadas. Esta mezcla de excipientes se introdujo en el sistema FIA y el espectro correspondiente se muestra en la [Figura 3.9](#).

Como puede observarse, la presencia de excipientes no interfirió en la región espectral utilizada para la determinación simultánea de LVD y CBD (290-540 nm).

3.4.5 Parámetros Analíticos

3.4.5.1 Aplicación de PLS-1

Previamente los espectros fueron preprocesados. En primer lugar, se aplicó el

algoritmo de Savitsky-Golay ^[82] utilizando un polinomio de segundo orden y un tamaño de ventana de 7 puntos. Luego, tanto los espectros suavizados como las concentraciones fueron centrados en la media.

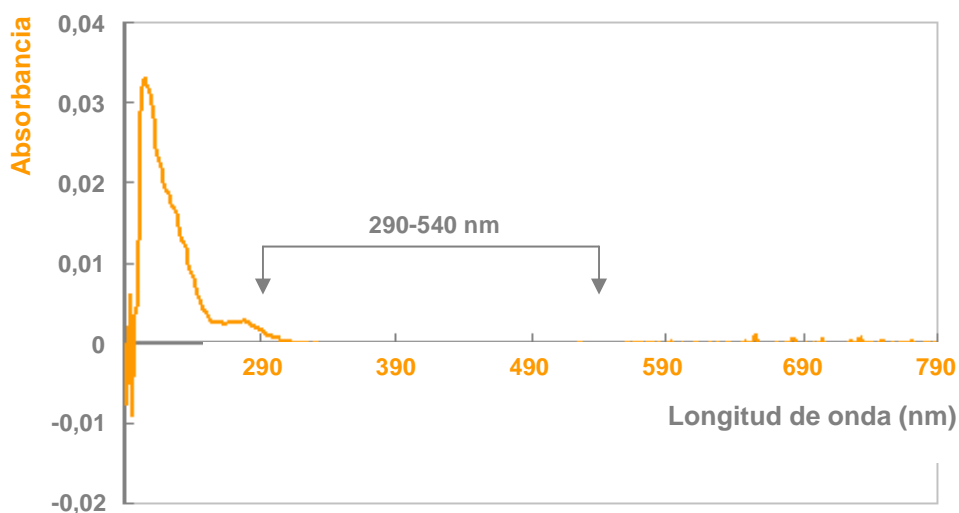


Figura 3.9. Espectro de una solución conteniendo diferentes excipientes.

La calibración se llevó a cabo aplicando la técnica de validación cruzada. El número óptimo de factores para cada analito se determinó utilizando el criterio de Haaland y Thomas ^[64]. Una vez establecidos los mismos, se analizaron los datos espectrales correspondientes al conjunto de validación.

Para la interpretación y comparación de los resultados se calcularon, para cada analito, la raíz cuadrada del error cuadrático medio (RMSE), el cual es un estimador del error absoluto de predicción tanto para los conjuntos de calibración como de validación, y el error relativo de predicción (REP):

^[82] A. Savitsky, M.E.J. Golay, *Anal. Chem.* 36 (1964) 1627.

$$\text{RMSE} = \left[\frac{\sum_{n=1}^n (c_{nom} - c_{pred})^2}{n} \right]^{1/2} \quad \text{Ecuación 3.4}$$

$$\text{REP} = \frac{100}{c_{med}} \left[\frac{\sum_{n=1}^n (c_{nom} - c_{pred})^2}{n} \right]^{1/2} \quad \text{Ecuación 3.5}$$

donde c_{nom} es la concentración nominal, c_{pred} la concentración predicha por el modelo y c_{med} es la concentración media. En la [Tabla 3.2](#) se detallan los parámetros estadísticos correspondientes a los modelos de regresión como así también los que resultaron de aplicar estos modelos al conjunto de validación. Como puede observarse, todos los valores de RMSE, REP y R^2 para ambos conjuntos fueron satisfactorios para los dos analitos estudiados. También la tabla proporciona la sensibilidad (SEN) y el límite de detección (LOD). La SEN para un analito k esta dada por:

$$\text{SEN}_k = \frac{1}{\|b_k\|} \quad \text{Ecuación 3.6}$$

donde $\| \cdot \|$ indica la norma Euclidiana y b_k es el vector de coeficientes de regresión apropiado para el componente k . Por otro lado, el LOD para el analito k se calculó

como:

$$LOD_k = 3 \frac{\sigma_{\text{r}}}{b_k} \quad \text{Ecuación 3.7}$$

donde σ_{r} representa el ruido instrumental. Para ambos analitos la SEN y el LOD resultaron satisfactorios.

La frecuencia de muestreo fue de 22 h⁻¹.

Tabla 3.2. Parámetros estadísticos obtenidos al aplicar PLS-1.

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	ANALITO	
	LVD	CBD
Calibración		
Factores	3	2
RMSE-CV (mg mL ⁻¹)	0,0059	0,0029
REP (%)	1,84	4,49
R ²	0,999	0,990
Validación		
RMSE-P (mg mL ⁻¹)	0,0131	0,0017
REP (%)	4,18	4,89
R ²	0,999	0,997
Figuras de Mérito		
SEN (mL mg ⁻¹)	0,36	2,82
LOD (mg mL ⁻¹)	0,015	0,003

3.4.5.2 Aplicación a Muestras Reales y Estudio de Recuperación

Una vez obtenidos y validados los modelos de calibración para cada analito, el método propuesto se aplicó a preparaciones farmacéuticas comerciales. Los

resultados se compararon con el método farmacopea [7] que detecta espectrofotométricamente ambos analitos (LVD + CBD) a 280 nm. En la [Tabla 3.3](#) puede apreciarse que los valores obtenidos aplicando el método propuesto fueron concordantes con el método farmacopea y con lo declarado por el laboratorio productor. En todos los casos, el error relativo (RE) fue menor al 5 %.

Tabla 3.3. Resultados del análisis de muestras reales con el método FIA propuesto.

MÉTODO	LEBOCAR [®] A			LEBOCAR [®] B		
	LVD	CBD	LVD + CBD	LVD	CBD	LVD + CBD
Contenido declarado ^a	250	25	--	100	25	--
Farmacopea ^a	--	--	278 (1)	--	--	124 (1)
FIA ^a	248 (2)	24 (1)	272 (2)	100 (1)	24 (1)	124 (1)
Recuperación (%) ^b	99,4	96,0	98,9	100,4	96,0	99,5
RE (%) ^b	-0,8	-4,0	-2,2	0,4	-4,0	-0,8

Las muestras fueron analizadas por triplicado. Entre paréntesis se expresa la desviación estándar.

^a Los resultados están expresados en mg por comprimido.

^b Los porcentajes de recuperación y los errores relativos (RE) fueron calculados para LVD y CBD en relación al contenido declarado y para LVD + CBD en relación a lo determinado por el método farmacopea.

Por otro lado, se evaluó la exactitud del método mediante un estudio de recuperación ([Tabla 3.4](#)). Los resultados de este estudio fueron óptimos ya que se obtuvieron porcentajes de recuperación entre 99 y 101 % para LVD y entre 91 y 104 % para CBD. La precisión, representada por la repetibilidad y expresada como la desviación estándar relativa (RSD), fue de 1,4 % para LVD y de 0,8 % para CBD.

Tabla 3.4. Resultados correspondientes al estudio de recuperación.

	LEBOCAR [®] A				LEBOCAR [®] B			
	LVD		CBD		LVD		CBD	
Agregado ^a	0,432	0,863	0,085	0,170	0,421	0,842	0,082	0,165
Encontrado ^a	0,426	0,872	0,088	0,172	0,425	0,853	0,074	0,151
Recuperación (%)	99 (3)	101 (2)	104 (3)	101 (4)	101 (2)	101 (3)	91 (1)	92 (2)

Las muestras fueron analizadas por triplicado. Entre paréntesis se expresa la desviación estándar.

^a Los resultados están expresados en mg por mg de comprimido.

3.5 CONCLUSIONES PARCIALES

En base a los resultados obtenidos podemos decir que la determinación enzimática simultánea de LVD y CBD en preparaciones farmacéuticas es factible utilizando datos espectrales de absorción molecular y aplicando sobre los mismos PLS-1 en la región comprendida entre 290 y 540 nm. Esta técnica de calibración multivariada pudo resolver exitosamente el importante solapamiento espectral en mezclas de LVD y CBD con alta relación de concentraciones (4/1; 10/1). Un diseño experimental simple permitió obtener, con un pequeño número de mezclas, óptimos modelos de regresión para cada analito. La capacidad predictiva de los mismos se incrementó por medio de una adecuada selección de variables, la selección de un óptimo número de factores y un apropiado tiempo de reacción.

La modalidad FIA reversa permitió economizar el consumo de reactivo, en este caso PFO. Por otro lado, las partículas de excipientes no disueltas en el medio fueron retenidas exitosamente en el filtro de algodón. Los excipientes solubles no generaron interferencias en la región espectral de interés para la determinación de ambos analitos.

El método propuesto se validó contra un método oficial y además mediante estudios de recuperación.

El método FIA propuesto es rápido y de bajo costo, pudiendo ser una alternativa

interesante para efectuar análisis de rutina que contribuyan al control de calidad de este tipo de preparaciones farmacéuticas.

Parte **B**



DETERMINACIÓN DE LVD Y CBD

UTILIZANDO UN SISTEMA FB Y MLR-SPA

3.6 PARTE EXPERIMENTAL

3.7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.8 CONCLUSIONES PARCIALES

3.6 PARTE EXPERIMENTAL

3.6.1 Equipamiento y Programas Quimiométricos

- ✓ Espectrofotómetro UV-visible con arreglo de diodos Hewlett Packard modelo 8453.
- ✓ pHmetro Metrohm modelo 713.
- ✓ Celda de flujo Hellma con un volumen interno de 18 μL .
- ✓ Bomba peristáltica Gilson modelo Minipuls 3.
- ✓ Válvulas solenoides de tres vías Cole Parmer.
- ✓ Accionador electrónico de válvulas (construido en el laboratorio).
- ✓ Cámara de mezclado de Teflon® de 2 mL (construida en el laboratorio).
- ✓ Tubos de línea de Teflon® de 0,8 mm de diámetro interno y tubos de bomba de Tygon® de 1,29 mm de diámetro interno.
- ✓ Programas quimiométricos Unscrambler® versión 9.5 y Matlab® versión 5.1.

3.6.2 Reactivos y Soluciones

Todas las soluciones se prepararon con agua ultra pura (18 m Ω) y todos los reactivos químicos que se utilizaron fueron de grado analítico.

- ✓ Solución reguladora de fosfato 0,1 mol L⁻¹ de pH 7,0.

- ✓ Soluciones patrón de LVD (Saporiti) y CBD (Saporiti) de 0,800 mg mL⁻¹ y 0,400 mg mL⁻¹, respectivamente. Las mismas se prepararon en solución reguladora de fosfato de pH 7,0. Posteriormente, se protegieron de la luz y almacenaron a 4 °C. Las soluciones estándar fueron preparadas en el sistema por dilución apropiada de las soluciones patrón con solución reguladora.
- ✓ Extracto crudo conteniendo PFO. A partir del mismo se prepararon las soluciones de trabajo por dilución apropiada con solución reguladora. Estas soluciones se conservaron a 4 °C hasta el momento de su utilización.
- ✓ Muestras de Lebocar (Pfizer) y Parkinel (Bagó) en dos presentaciones cada una: 250/25 (A) y 100/25 (B) mg de LVD/CBD, respectivamente.

3.6.3 Metodología Analítica

3.6.3.1 Preparación de los Conjuntos de Calibración y Validación

En este caso también se realizó un diseño experimental central compuesto. El conjunto de calibración estuvo conformado por nueve mezclas, con tres repeticiones del punto central. Los intervalos de concentración estuvieron comprendidos entre 0,057 y 0,553 mg mL⁻¹ para LVD y entre 0,021 y 0,070 mg mL⁻¹ para CBD (Figura 3.10). Los mismos también fueron seleccionados teniendo en cuenta la relación LVD/CBD presente en las preparaciones comerciales analizadas (4/1 a 10/1).

Para evaluar la capacidad predictiva de los modelos de calibración, se preparó un conjunto de validación formado por ocho mezclas, cuyas concentraciones estuvieron comprendidas dentro de los intervalos correspondientes a las mezclas de

calibración.

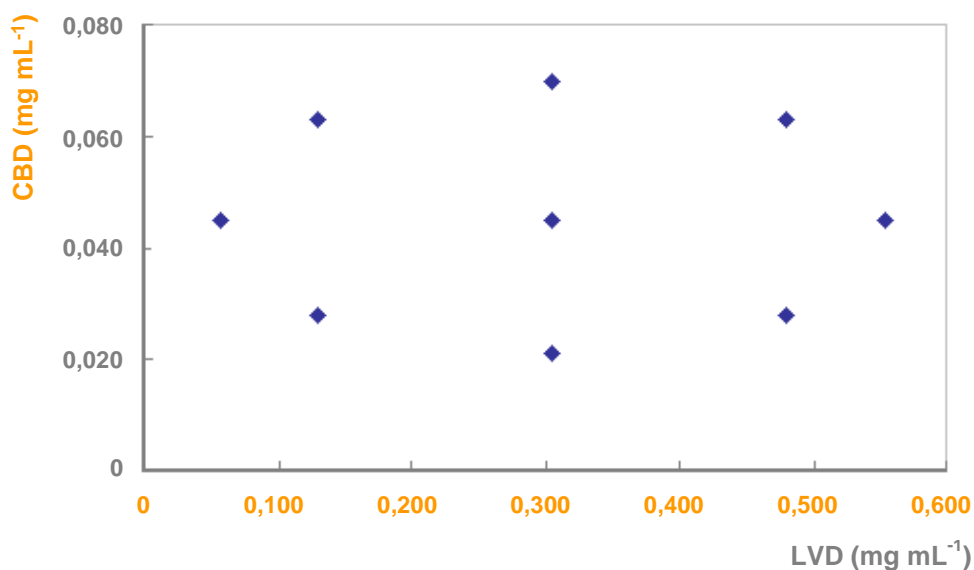


Figura 3.10. Concentraciones de las mezclas correspondientes al conjunto de calibración.

3.6.3.2 Preparación de las Muestras

Las preparaciones farmacéuticas analizadas se expenden en forma de comprimidos. Se pesaron 10 comprimidos de cada presentación los cuales se pulverizaron y homogeneizaron. Se pesó una cantidad apropiada que se disolvió en 100 mL de solución reguladora de fosfato de pH 7,0. Finalmente, la solución se filtró en línea por medio de un filtro tubular de algodón (FA) incorporado en el sistema FB (Figura 3.11).

3.6.3.3 Sistema FB

En la Figura 3.11 se muestra un diagrama del sistema FB propuesto. Para el

mismo se utilizaron seis válvulas solenoides de tres vías: cinco de ellas, V_{LVD} , V_{CBD} , V_M , V_{SR} y V_{PFO} , para dirigir las soluciones de LVD, CBD, muestra, solución reguladora y solución de PFO hacia la cámara de mezclado (CM), respectivamente; la sexta válvula, V_{CMA} , se utilizó para dirigir la mezcla proveniente de la CM o bien agua hacia la celda de flujo.

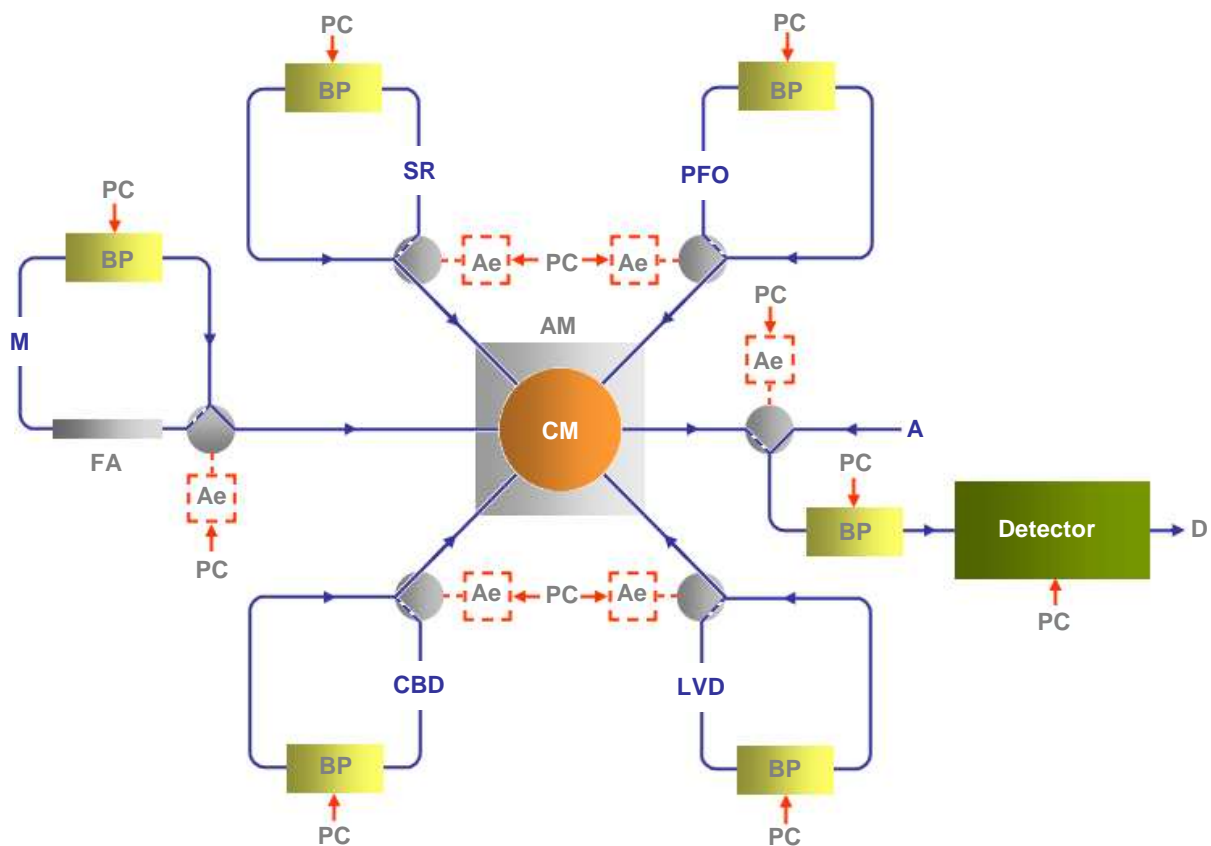


Figura 3.11. Diagrama del sistema FB propuesto. A: agua, SR: solución reguladora, M: muestra, Ae: accionador electrónico, AM: agitador magnético, BP: bomba peristáltica, CM: cámara de mezclado, D: desecho; FA: filtro de algodón, PC: computadora. Las válvulas solenoides están representadas por círculos grises. Las flechas azules indican la dirección de desplazamiento de los fluidos. Las flechas rojas representan la interfase paralela de comunicación a la computadora.

En la [Figura 3.12](#) se muestra un esquema de la CM.

Para controlar la bomba peristáltica, las válvulas solenoides y el espectrofotómetro se utilizó una computadora con procesador Pentium (166 MHz). La conexión se realizó a través de a una interfase paralela. La misma computadora se utilizó para la recepción y posterior tratamiento de los datos. El programa de comando fue desarrollado en lenguaje gráfico Labview®, versión 5.1. La [Figura 3.13](#) muestra la ventana de diálogo diseñada para comandar el sistema FB propuesto.

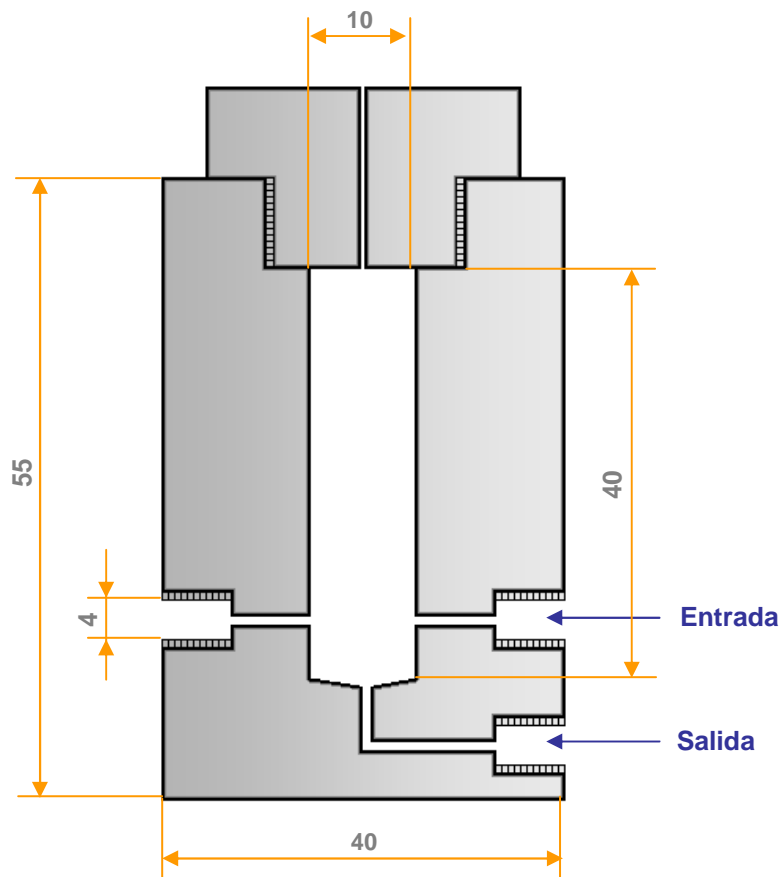


Figura 3.12. Esquema de la cámara de mezclado (CM) utilizada en el sistema FB propuesto. Las dimensiones están expresadas en mm.



Figura 3.13. Ventana de diálogo diseñada para comandar el sistema FB propuesto.

El incremento de la señal eléctrica proveniente de la PC necesario para accionar las válvulas se consiguió a través de un accionador electrónico (Ae).

3.6.3.4 Procedimiento Desarrollado

Un paso inherente a la implementación de la metodología FB es la obtención de factores de corrección debido a la diferencia de caudales en las distintas líneas. Como puede verse en la [Tabla 3.5](#), en nuestro sistema se encontraron diferencias

por lo que fue necesaria una corrección. La misma se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Almeida y col. [16].

En la [Tabla 3.5](#) también se muestra el esquema operativo del sistema FB propuesto. En el mismo se detallan los tiempos de accionamiento de las válvulas solenoides utilizados para llevar a cabo los distintos pasos del procedimiento, los que se describen a continuación:

✓ *Llenado de Canales.* En primer lugar, se llenaron todos los canales con sus respectivas soluciones. Las válvulas permanecieron desactivadas lo que permitió que los fluidos retornen a sus respectivos sitios de partida. Luego, cada válvula fue accionada durante un intervalo de 3 s. De esta forma, se consiguió llenar los canales en los tramos que van desde las válvulas V_{LVD} , V_{CBD} , V_M , V_{SR} y V_{PFO} hasta la CM ([Figura 3.11](#)). Finalmente, se accionó la válvula V_{CMA} durante 5 s y el exceso de soluciones dentro de la CM fue dirigido hacia el desecho. Esta operación demandó un tiempo total de 8 s y se realizó siempre que se cambió una solución en un canal determinado.

✓ *Lavado de la CM.* El lavado de la CM se llevó a cabo con solución reguladora. Para ello, se accionó la válvula V_{SR} , durante el tiempo necesario para el llenado de la CM. Posteriormente, se accionó la válvula V_{CMA} durante 50 s con el objeto de evacuar el líquido de lavado. Se realizó el lavado de la CM entre medida y medida.

✓ *Preparación del Blanco.* El blanco se obtuvo activando las válvulas V_{SR} y V_{PFO} durante un tiempo apropiado (t_{SR} y t_{PFO}). De esta forma, solución reguladora y

PFO fueron conducidas a la CM. Luego de permanecer 12 s en la misma, la mezcla fue dirigida al detector donde se registró la señal.

✓ *Preparación de las Mezclas.* Para la preparación de las mezclas correspondientes a los conjuntos de calibración y validación se accionaron simultáneamente las válvulas V_{LVD} , V_{CBD} y V_{SR} durante un tiempo t_{LVD} , t_{CBD} y t_{SR} , respectivamente. Con esto, alícuotas de cada solución se dirigieron hacia la CM. Concluida esta operación, se accionó inmediatamente la válvula V_{PFO} lo que dio lugar al comienzo de la reacción (tiempo 0 de reacción). La mezcla se homogeneizó por agitación durante 12 s y luego se activó la válvula V_{CMA} por 20 s para dirigir la mezcla a la celda de detección. En la misma, el flujo se detuvo durante 129 s (desactivando V_{CMA}) y cumplido este tiempo se registró el espectro de la mezcla. Este procedimiento se repitió para cada punto correspondiente al conjunto de calibración y validación variando solamente los tiempos t_{LVD} , t_{CBD} y t_B .

✓ *Preparación de la Muestras.* Para obtener el espectro de las muestras se procedió de igual forma que en el punto anterior, pero en lugar de accionar las válvulas V_{LVD} y V_{CBD} se accionó la válvula V_M durante un tiempo t_M .

Es importante aclarar que el volumen total adicionado a la cámara debe permanecer constante para todos los puntos del diseño experimental y el análisis de las muestras. Por eso, t_M y t_{PFO} permanecieron constantes y, en el caso de t_{LVD} y t_{CBD} , cuando éstos se incrementaron se disminuyó t_{SR} y viceversa. El tiempo

transcurrido hasta detener el flujo en la celda de detección fue de 52 s.

Tabla 3.5. Esquema operativo del sistema FB propuesto.

ETAPA OPERATIVA	VÁLVULA SOLENOIDE					
	V _{LVD}	V _{CBD}	V _M	V _{SR}	V _{PFO}	V _{CM/A}
Caudal (mL min⁻¹)	2,20	2,09	2,25	2,18	2,30	2,30
Tiempo de accionamiento (s)						
Llenado de canales	3	3	3	3	3	5
Lavado						
Llenado de la CM	0	0	0	47	0	0
Vaciado de la CM	0	0	0	0	0	50
Blanco	0	0	0	27,5	19,5	20*
Calibración	1,3-12,5	3,8-12,6	0	5,7-19,7	19,5	20*
Validación	2,9-10,9	5,4-10,6	0	8,2-17,4	19,5	20*
Muestras	0	0	13,3	13,8	19,5	20*

* Tiempo necesario para que los productos de reacción se dirijan desde la cámara de mezclado (CM) a la celda de detección.

V_{LVD}: válvula LVD; V_{CBD}: válvula CBD; V_M: válvula muestra; V_{SR}: válvula solución reguladora; V_{PFO}: válvula PFO; V_{CM/A}: válvula CM/agua.

3.7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.7.1 Optimización de Variables Químicas y Parámetros FB

La AE se optimizó en función de los parámetros estadísticos obtenidos cuando se aplicó PLS-1 y MLR-SPA a los datos espectrales correspondientes a los conjuntos de calibración y validación. Se estudió el intervalo entre 1000 y 2000 UE, siendo el valor óptimo 1200 UE. Como medio de reacción y de disolución de las soluciones estándares y de la muestra se utilizó nuevamente una solución reguladora de fosfato 0,1 mol L⁻¹.

En cuanto a los parámetros FB se estudiaron los volúmenes de reactivos y de muestra a introducir en la CM, el tiempo de mezclado y el tiempo transcurrido hasta detener el flujo en la celda de detección. La optimización se realizó por el método univariado y una vez más el criterio seleccionado fue un compromiso entre sensibilidad y reproducibilidad de la señal analítica. Los resultados de este estudio se muestran en la [Tabla 3.6](#).

La CM resultó ser muy apropiada ya que permitió un eficiente contacto enzima-sustrato y una adecuada mezcla de todos los componentes de la reacción. Por otro lado, el sistema FB permitió la preparación automática de las mezclas de calibración y validación lo que redujo el tiempo de análisis y el consumo de las soluciones de LVD y CBD. La frecuencia de muestreo fue de 18 h⁻¹.

Tabla 3.6. Valores óptimos para los parámetros FB.

PARÁMETRO FB	INTERVALO ESTUDIADO	VALOR ÓPTIMO
Volumen (mL)		
Muestra	0,25-0,75	0,50
Solución Reguladora	0,25-0,75	0,50
PFO	0,25-0,75	0,75
Tiempo (s)		
Mezclado	5-20	12
Tiempo Transcurrido hasta Detener el Flujo ^a	40-60	52

^a Tiempo transcurrido entre el ingreso de PFO a la CM (inicio de la reacción) y la llegada de la mezcla de reacción a la celda de detección.

3.7.2 Selección de Regiones Espectrales

En la sección 3.4.2 se discutió el comportamiento espectral de los productos de la oxidación de LVD y CBD. Como se mencionó, existen diferencias espectrales que pueden ser útiles si se desean aplicar métodos de calibración multivariada. En esta parte del trabajo se aplicó Regresión Lineal Múltiple, previa selección de variables utilizando el Algoritmo de las Proyecciones Sucesivas (MLR-SPA). Para poder comparar los resultados obtenidos por dicho método se aplicó PLS-1 y Regresión Lineal Univariada (ULR).

En primer lugar, se realizó una inspección visual de los espectros correspondientes a los conjuntos de calibración y validación. A partir de este análisis, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el trabajo previo (sección 3.4.2), se seleccionó para la aplicación de MLR-SPA y PLS-1 la región espectral

comprendida entre 295 y 540 nm. Adicionalmente para PLS-1 fue seleccionada la región de mayor intensidad de absorción de cada analito: 450-540 nm para LVD y 340-390 nm para CBD. En todos los casos se obtuvieron medidas cada 1 nm. Por último, para ULR se utilizaron los valores seleccionados por Fatibello y col. [26], es decir, 500 nm para LVD y 360 nm para CBD.

3.7.3 Optimización del Tiempo de Reacción

La optimización del tiempo que se detiene el flujo implica el tiempo en que se permite desarrollar la reacción de oxidación de LVD y CBD, en presencia de PFO. Para optimizar dicho tiempo se hicieron reaccionar 1200 unidades de PFO, en medio de solución reguladora de pH 7,0, con las diferentes mezclas correspondientes a los conjuntos de calibración y validación. Cada vez que la mezcla llegó a la celda de detección se detuvo el flujo durante distintos tiempos, dentro de un intervalo de 60 hasta 600 s, y se registraron los espectros correspondientes.

La absorción de los productos de reacción se incremento significativamente en función del tiempo. El criterio elegido para establecer el tiempo óptimo de reacción se basó en el menor error relativo de predicción (RMSE) obtenido para el conjunto de validación cuando se aplicó MLR-SPA y PLS-1 a los datos espectrales correspondientes a cada tiempo estudiado. En base a esto, el tiempo óptimo del flujo detenido en la celda fue de 129 s y, por lo tanto, el tiempo óptimo de reacción 181 s.

3.7.4 Parámetros Analíticos

3.7.4.1 Regresión Lineal Univariada (ULR)

En la [Tabla 3.7](#) pueden observarse los resultados luego de aplicar este método. Los parámetros estadísticos calculados no fueron satisfactorios para ninguno de los analitos estudiados.

3.7.4.2 PLS-1 y MLR-SPA

Previo a la aplicación de PLS-1 y MLR-SPA los espectros fueron suavizados. Para ello se utilizó el algoritmo de la media móvil, con un tamaño de ventana de 3 puntos. Los espectros suavizados y las concentraciones fueron centrados en la media.

3.7.4.2.1 PLS-1

La calibración se llevó a cabo aplicando la técnica de validación cruzada. El número óptimo de factores para cada analito se determinó utilizando el criterio de Haaland y Thomas ^[64]. Una vez establecidos los mismos, se analizaron los datos espectrales correspondientes al conjunto de validación. En la [Tabla 3.7](#) se detallan los parámetros estadísticos correspondientes a las distintas regiones espectrales analizadas. Para ambos analitos, los valores de RMSE en la calibración cruzada y en la validación resultaron óptimos en la región 295-540 nm. En el caso de CBD, los valores obtenidos cuando se analizó la región 340-390 nm fueron comparables con

aquellos obtenidos cuando se utilizó la región 295-540 nm. Sin embargo, para LVD los valores de los parámetros calculados al analizar la región 450-540 nm fueron poco satisfactorios. La [Tabla 3.7](#) también informa los valores de sensibilidad (SEN) y límites de detección (LOD). Los mismos fueron calculados como se explica en la sección 2.3.3.5.1. En el caso de LVD, la SEN y el LOD fueron comparables y satisfactorios en ambas regiones. Sin embargo, para CBD estas figuras de mérito dieron mejores resultados en la región 295-540 nm.

3.7.4.2.2 MLR-SPA

En la [Tabla 3.7](#) se presentan los parámetros estadísticos y las figuras de mérito correspondientes a los modelos obtenidos con MLR-SPA. En la [Figura 3.14](#) se muestran las variables seleccionadas por SPA. Un análisis detallado de esta figura permite verificar que las variables seleccionadas por este algoritmo corresponden a las regiones de mayor absorbancia de cada analito. Por eso, la predicción para LVD resultó óptima cuando se incluyeron los valores de absorbancia a 295, 527, 530, 533 nm y, en el caso de CBD, cuando se incluyeron las absorbancias a 364, 391 y 400 nm. Como puede verse, SPA seleccionó algunas variables de importancia que están fuera de las regiones de mayor absorbancia. Por ejemplo, los valores de absorbancia a 295 nm fueron seleccionados también para el modelo de CBD. Este hecho puede estar relacionado con el mecanismo que utiliza SPA para resolver los problemas de superposición espectral. En el modelo correspondiente a CBD, el coeficiente de regresión a 295 nm fue negativo lo que corrobora esta suposición.

Tabla 3.7. Parámetros estadísticos obtenidos al aplicar ULR, PLS-1 y MLR-SPA.

ANALITO	PARÁMETRO ESTADÍSTICO	MODELO			
		ULR	PLS-1	MLR-SPA	
LVD	Variables (nm)	500	295-540	450-540	295, 441, 527, 530, 533
	Calibración				
	Factores	--	3	1	--
	IC (mg mL ⁻¹)				0,057-0,553
	RMSE ^a (mg mL ⁻¹)	0,0565	0,0047	0,0657	0,0252
	R ²	0,9594	0,9995	0,9077	0,9876
	Validación				
	IC (mg mL ⁻¹)				0,129-0,481
	RMSE (mg mL ⁻¹)	0,1073	0,0272	0,0959	0,0095
	R ²	0,6957	0,9939	0,6779	0,9981
	Predicción				
	RMSE ^b (mg mL ⁻¹)	0,0662	0,0074	0,0681	0,0100
	Figuras de Mérito				
	SEN (mL mg ⁻¹)	0,106	1,370	1,327	0,406
	LOD (mg mL ⁻¹)	0,218	0,017	0,017	0,131
CBD	Variables (nm)	360	295-540	340-390	295, 364, 391, 400, 493, 518
	Calibración				
	Factores	--	2	2	--
	IC (mg mL ⁻¹)				0,021-0,070
	RMSE ^a (mg mL ⁻¹)	0,0039	0,0033	0,0041	0,0035
	R ²	0,9801	0,9774	0,9645	0,9779
	Validación				
	IC (mg mL ⁻¹)				0,030-0,059
	RMSE (mg mL ⁻¹)	0,0046	0,0030	0,0036	0,0020
	R ²	0,9734	0,9932	0,9935	0,9916
	Predicción				
	RMSE ^b (mg mL ⁻¹)	0,0082	0,0034	0,0074	0,0038
	Figuras de Mérito				
	SEN (mL mg ⁻¹)	1,87	15,60	3,57	1,57
	LOD (mg mL ⁻¹)	0,015	0,001	0,002	0,040

IC: intervalo de concentración.

^a RMSE-CV para PLS-1 y RMSE-C para MLR-SPA.

^b RMSE calculado con las muestras reales.

En cuanto a las figuras de mérito (Tabla 3.7) los modelos proporcionaron una SEN más baja y un LOD más alto respecto de PLS-1.

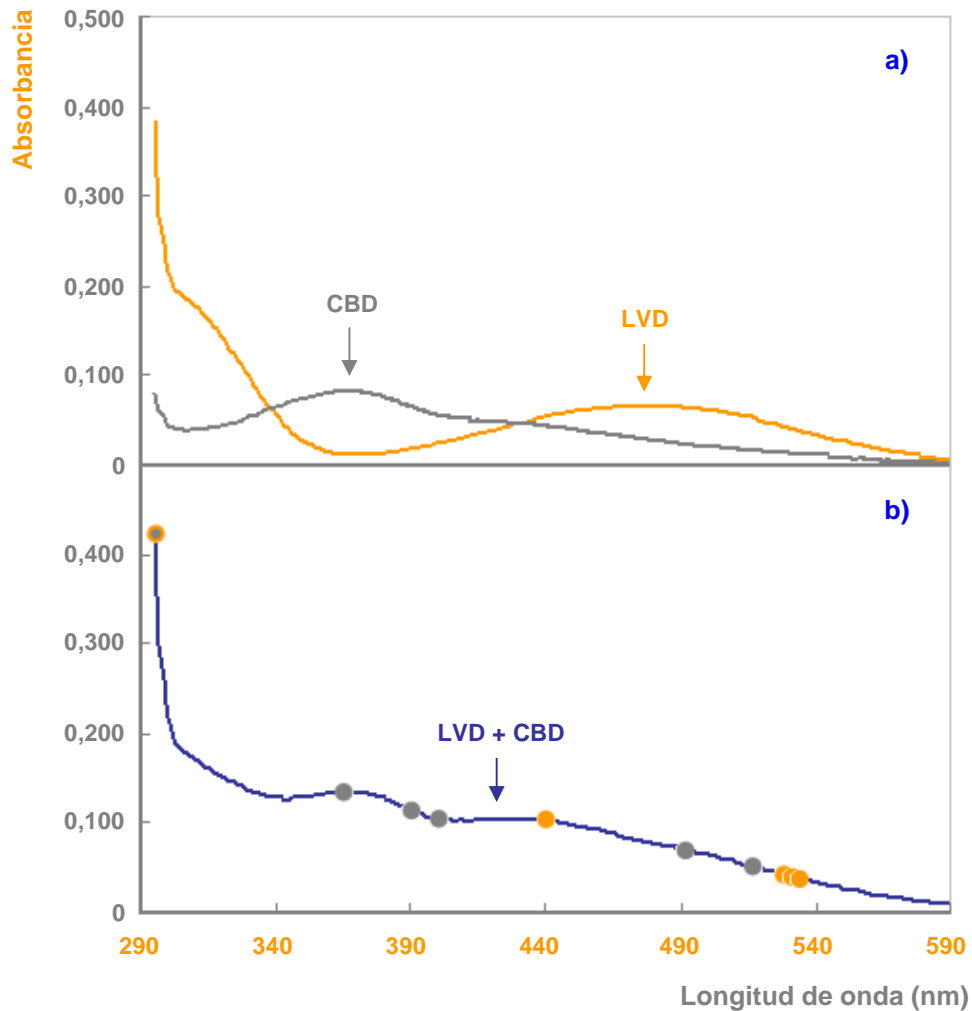


Figura 3.14. a) Espectros de los analitos puros luego de su reacción en presencia de PFO. **b)** Espectro de una mezcla de LVD y CBD ($0,305$ y $0,045$ mg mL^{-1} , respectivamente). Los puntos son las variables seleccionadas por MLR-SPA: en naranja LVD y en gris CBD.

3.7.4.3 Estudio Comparativo de los Modelos Quimiométricos

Para evaluar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los

valores nominales y predichos por los modelos quimiométricos obtenidos se llevo a cabo el test de la *Región Elíptica de Confianza Conjunta (EJCR)* [83]. Se realizó para cada analito un ajuste por mínimos cuadrados ordinarios (OLS) de 12 valores nominales versus los correspondientes valores predichos por cada método (8 del conjunto de validación más 4 muestras reales). Las elipses que contienen el punto teórico ($a = 0$, $b = 1$), donde a representa la ordenada al origen y b la pendiente, indican la ausencia de errores proporcionales y sistemáticos. Por otro lado, el tamaño de la región de confianza conjunta, para un determinado nivel de confianza α , depende directamente del error experimental \hat{s}^2 . Es por ello, que si se disponen de pocos datos experimentales o existe falta de ajuste en los mismos, se sobreestima el valor de \hat{s}^2 y por ende la región de confianza conjunta [84]. La [Figura 3.15](#) muestra los gráficos de EJCR para los cuatro modelos obtenidos. Como puede observarse, PLS en la región 295-540 nm y MLR-SPA presentan una excelente capacidad predictiva para ambos analitos.

3.7.4.4 Aplicación a Muestras Reales

El método FB propuesto se aplicó a preparaciones farmacéuticas comerciales.

La [Tabla 3.8](#) muestra los resultados obtenidos al aplicar los siguientes métodos:

- ✓ FB: aplicando PLS-1 en la región 295-540 nm y MLR-SPA.
- ✓ Farmacopea: espectrofotométrico a 280 nm y HPLC [7].

[83] A.G. González, M.A. Herrador, A.G. Asuero, *Talanta* 48 (1999) 729.

[84] A. Martinez, J. Riu, O. Busto, J. Guasch, F.X. Rius, *Anal. Chim. Acta* 406 (2000) 257.

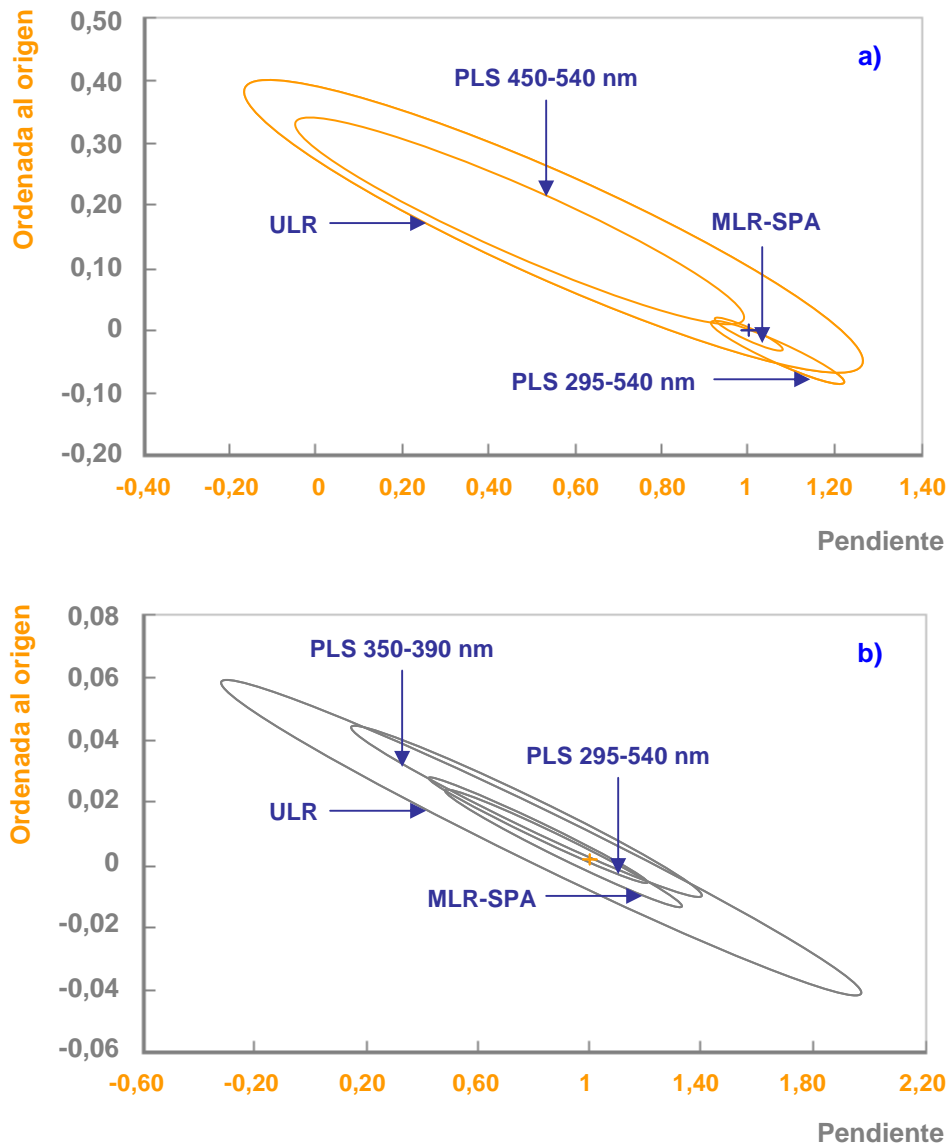


Figura 3.15. Regiones Elípticas de Confianza Conjunta (EJCR) para la pendiente a y la ordenada al origen b , correspondientes a las regresiones de concentración nominal vs. predichas para cada modelo: ULR, PLS-1 y MLR-SPA. **a)** LVD y **b)** CBD. Las cruces representan el punto teórico ($a = 0$, $b = 1$).

Como puede observarse, no se registraron diferencias significativas entre las concentraciones de LVD y CBD obtenidas por las dos variantes del método FB y las obtenidas por HPLC para todas las muestras analizadas. Tampoco se registraron

diferencias significativas entre la suma de las concentraciones de cada analito (LVD + CBD) y el método espectrofotométrico. Adicionalmente, en la [Tabla 3.8](#) se muestran los valores de RMSE cuando fueron aplicados PLS-1 y MLR-SPA. La repetibilidad expresada como la desviación estándar relativa (RSD %) fue 1,3 % para LVD y 2,1 % para CBD en el caso de PLS, y de 3,6 % para LVD y 3,7 % para CBD en el caso de MLR-SPA (en todos los casos $n = 4$).

Tabla 3.8. Resultados del análisis de muestras reales y test “t” de significancia.

MUESTRA	NOMINAL		FARMACOPEA			MÉTODO PROPUESTO					
			HPLC		$\lambda = 280 \text{ nm}$	PLS-1 (295-540 nm)			MLR-SPA		
	LVD	CBD	LVD	CBD	LVD+CBD	LVD	CBD	LVD+CBD	LVD	CBD	LVD+CBD
Lebocar [®] A	250	25	235 (2)	24 (1)	276 (2)	238 (1)	24 (1)	262 (1)	237 (1)	23 (1)	260 (1)
Lebocar [®] B	100	25	104 (1)	25 (1)	123 (1)	100 (2)	23 (1)	123 (2)	100 (1)	23 (1)	123 (1)
Parkinel [®] A	250	25	243 (1)	23 (1)	272 (2)	242 (1)	25 (1)	267 (1)	249 (2)	24 (1)	273 (2)
Parkinel [®] B	100	25	87 (1)	21 (1)	122 (1)	92 (2)	21 (1)	113 (2)	94 (1)	22 (1)	116 (1)
t calculado ^a						0,3	0,3	2,4	1,2	0,9	1,35
t crítico ^b									3,18		
n									4		

Las muestras fueron analizadas por triplicado. Entre paréntesis se expresa la desviación estándar. Los valores están expresados en mg por comprimido.

^a Para LVD y CBD: HPLC vs. método propuesto y para LVD+CBD: método espectrofotométrico vs. método propuesto.

^b Valor de “t” tabulado para un límite de confianza del 95 %.

3.8 CONCLUSIONES PARCIALES

En base a los resultados obtenidos podemos decir que es posible la determinación enzimática simultánea de LVD y CBD en preparaciones farmacéuticas utilizando datos espectrales de absorción molecular y aplicando sobre los mismos PLS, en la región 295-540 nm y MLR-SPA. Los modelos de calibración obtenidos pudieron resolver exitosamente el solapamiento espectral en mezclas de LVD y CBD con alta relación de concentración (4/1; 10/1). El diseño experimental central compuesto permitió obtener modelos de calibración con un pequeño número de mezclas. Por otro lado, los modelos MLR se construyeron utilizando cinco variables espectrales para LVD y seis para CBD. Los resultados obtenidos con estos modelos fueron comparables a los obtenidos por PLS-1, el cual utilizó 246 variables.

El sistema FB permitió la preparación automática de las mezclas correspondientes a los conjuntos de calibración y validación, lo que implica una importante reducción en el tiempo total de análisis. Por otro lado, los excipientes fueron retenidos exitosamente en el filtro de algodón y, por lo tanto, no interfirieron en la determinación.

La estimación de distintos parámetros estadísticos permitió evaluar la precisión y la exactitud del método propuesto. El mismo se validó en contraste con un método

oficial.

El método FB propuesto es rápido y de bajo costo pudiendo ser una alternativa interesante para efectuar análisis de rutina que contribuyan al control de calidad en este tipo de preparaciones farmacéuticas.

3.9 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

Las metodologías FIA y FB permitieron implementar los correspondientes métodos analíticos para la determinación simultánea de LVD y CBD.

Los métodos desarrollados están basados en el uso de una enzima que cataliza la reacción química de oxidación. Los productos de dicha reacción presentaron un fuerte solapamiento, que fue exitosamente resuelto aplicando técnicas de calibración multivariada.

En la [Tabla 3.9](#) se comparan ambas metodologías cuando se aplicó PLS-1.

Tabla 3.9. Comparación de los métodos FIA y FB propuestos.

	MÉTODO FIA	MÉTODO FB
PFO (UE)	230	1200
Frecuencia de Muestreo (h ⁻¹)	22	18
LOD (mg mL ⁻¹)		
LVD	0,015	0,017
CBD	0,003	0,001
SEN (mL mg ⁻¹)		
LVD	0,36	1,37
CBD	2,82	15,60
Precisión (RSD %)		
LVD	1,4	1,3
CBD	0,8	2,1

Ambos métodos proporcionaron LOD's comparables y satisfactorios. El método

FB resultó más sensible y esto probablemente esté relacionado con la cantidad de PFO que cataliza la reacción. La precisión fue comparable para LVD y mejor para CBD cuando se utilizó FIA. En cuanto a la frecuencia de muestreo, si bien fue ligeramente mayor para el método FIA debe considerarse que el sistema FB ofrece la posibilidad de realizar la calibración y validación de forma completamente automática, lo que reduce el tiempo total de análisis.

Los dos métodos presentaron parámetros estadísticos satisfactorios. Se analizaron muestras reales y la validación se realizó mediante estudios de recuperación y contraste con métodos de referencia disponibles en Farmacopea.

Ambas opciones representan una alternativa por demás interesante para su implementación en el análisis de rutina en Laboratorios de Control de Calidad de Medicamentos.

Capítulo 4



DETERMINACIÓN DE CATECOLAMINAS EN INYECTABLES

- 4.1 OBJETIVO
 - 4.2 INTRODUCCIÓN
 - 4.3 PARTE EXPERIMENTAL
 - 4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN
 - 4.5 CONCLUSIONES PARCIALES
-

4.1 OBJETIVO

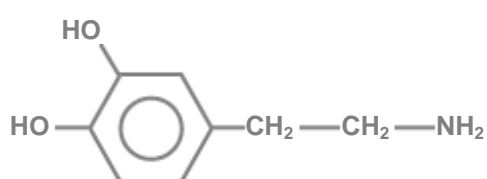
En esta última parte de la tesis, el propósito es diseñar y optimizar un sistema automático FB con detección quimioluminiscente para la determinación de dopamina (DOP) norepinefrina (NOR) y epinefrina (EPI) en preparaciones farmacéuticas. El método está basado en la inhibición que producen estos compuestos en la señal generada por un sistema de luminol-hexacianoferrato de potasio (III) en medio alcalino.

4.2 INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso simpático (SNS) tiene una intervención vital en la regulación homeostática de una amplia variedad de funciones entre las cuales se encuentra la frecuencia cardíaca, la tensión arterial, el tono de la vía aérea bronquial y el metabolismo de los hidratos de carbono y los ácidos grasos. Normalmente ocurre una estimulación del SNS en respuesta a la actividad física, la tensión psicológica, las reacciones alérgicas generalizadas, entre otras. Dado que las funciones mediadas o modificadas por el SNS son diversas, los agentes que imitan o alteran su actividad son útiles en el tratamiento de varios trastornos clínicos tales como hipertensión, shock, insuficiencia cardíaca y arritmias, asma, alergia y anafilaxia.

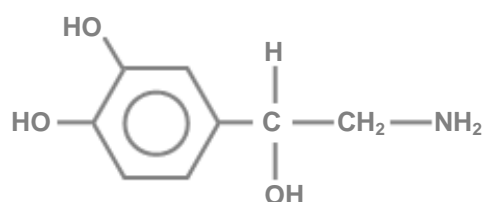
El conjunto de respuestas fisiológicas y metabólicas que sigue a la estimulación de los nervios simpáticos en los mamíferos, está mediado habitualmente por el neurotransmisor *norepinefrina*. Como parte de la respuesta al estrés también se estimula la médula suprarrenal lo que provoca la elevación de las concentraciones de *norepinefrina* y *epinefrina* en la circulación. Las acciones de estas dos catecolaminas son muy similares en algunos sitios del organismo pero difieren significativamente en otros. La *dopamina* es una tercera catecolamina natural. Aunque se halla predominantemente en los ganglios basales del sistema nervioso central (SNC), se han identificado terminales nerviosas dopaminérgicas y receptores

específicos para esta catecolamina en otros sitios del SNC y en la periferia. Debido a su función, tanto las catecolaminas naturales como las drogas que imitan sus acciones, comprenden uno de los grupos más estudiados de agentes farmacológicos. En la [Figura 4.1](#) puede observarse la estructura química de dopamina (DOP), norepinefrina (NOR) y epinefrina (EPI).



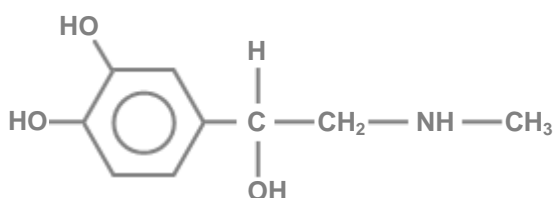
M_r 153,1

DOP



M_r 169,1

NOR



M_r 183,1

EPI

Figura 4.1. Estructura química y masa relativa (M_r) de dopamina (DOP), norepinefrina (NOR) y epinefrina (EPI).

La DOP (3,4-dihidroxifeniletilamina) es útil en el tratamiento de algunos tipos de shock como el cardiogénico o el séptico. Es particularmente beneficiosa para los

pacientes con oliguria y con resistencia vascular periférica baja o normal. La NOR ((*R*)-2-amino-1-(3,4-dihidroxifenil) etanol) tiene un uso terapéutico limitado a pacientes en shock, en los cuales la hipotensión es tan grave que se necesitan drogas vasoconstrictoras para mantener una tensión arterial adecuada para la perfusión del SNC. Los usos clínicos más comunes de la EPI ((*R*)-1-(3,4-dihidroxifenil)-2-metilaminoetanol) son para aliviar la dificultad respiratoria debido a broncoespasmo, brindar un rápido alivio de las reacciones hipertensivas a las drogas y otros alérgenos y prolongar la acción de los anestésicos locales. A su vez puede ser útil para restablecer el ritmo cardíaco en pacientes con paro cardíaco. También se utiliza como hemostático tópico en superficies sangrantes.

Debido a que estos fármacos no son efectivos cuando se administran por vía oral, la administración es por inyección (subcutánea o intravenosa). En el caso de epinefrina también puede inhalarse como aerosol o aplicarse en forma local en las mucosas o las superficies dañadas como solución acuosa [50].

La determinación cuantitativa de estos principios activos en preparados farmacéuticos es una importante contribución al control de calidad de los mismos. Los métodos oficiales, descritos en distintas farmacopeas internacionales, utilizan cromatografía líquida de alta presión (HPLC) [7] [8]. Sin embargo, se han propuesto numerosos métodos alternativos para la determinación de DOP, NOR y EPI en muestras biológicas y preparaciones farmacéuticas, mediante técnicas como: espectrofotometría UV-visible [44] [85] [86] [87] [88], fluorescencia [89], amperometría [46] [90],

[85] W.I. Mohamed, F.B. Salem, *Anal. Lett.* 17 (1984) 191.

voltimetría ^[91], quimioluminiscencia ^[43] ^[45] ^[92] ^[93] ^[94] ^[95] ^[96]. En la bibliografía consultada se observa una tendencia en la determinación a nivel traza de estos compuestos. Una de las estrategias por demás interesante para lograr este objetivo es la automatización en conjunto con la quimioluminiscencia. Se han propuesto sistemas que reúnen estas características ^[43] ^[45] ^[88] ^[89] ^[90], sin embargo, no se encuentran trabajos que propongan un método automático para el análisis de los tres principios activos con mínimos cambios en la configuración del sistema.

En esta última etapa de la tesis, se propone un sistema automático FB con detección quimioluminiscencia para la determinación DOP, NOR y EPI en preparados farmacéuticos. Se analizaron ampollas de dopamina de 100 y 200 mg/ampolla, norepinefrina de 4 mg/ampolla y epinefrina de 1 mg/ampolla. En todos los casos se analizaron dos marcas comerciales de cada analito.

4.2.1 Quimioluminiscencia (CL)

El uso analítico de la CL está experimentando un creciente interés ya que

^[86] I.A. Biryuk, V.V. Petrenko, B.P. Zorya, *Farm. Zh. (Kiw)* 2 (1992) 57.

^[87] P. Nagaraja, R.A. Vasantha, K.R. Sunitha, *J. Pharm. Bio. Anal.* 25 (2001) 417.

^[88] L.K. Abdulrahman, A.M. Al-Abachi, M.H. Al-Qaissy, *Anal. Chim. Acta* 538 (2005) 331.

^[89] A. Kojlo, J.M. Calatayud, *Anal. Chim. Acta* 308 (1995) 334.

^[90] E.M. Garrido, J.L.F.C. Lima, C. Delerue-Matos, *J. Pharm. Bio. Anal.* 15 (1997) 845.

^[91] K.D. Kozminski, D.A. Gutman, V. Davilla, D. Sulzer, A.G. Ewing, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3123.

^[92] O. Nozaki, T. Iwaeda, Y. Kato, *J. Biolumin. Chemilumin.* 11 (1996) 309.

^[93] J. Li, J. Lue, *Chinese J. Anal. Chem.* 25 (1997) 314.

^[94] L. Zhang, N. Teshima, T. Hasebe, M. Kurihara, T. Kawashima, *Talanta* 50 (1999) 677.

^[95] E. Nalewajko, R.B. Ramírez, A. Kojlo, *J. Pharm. Bio. Anal.* 36 (2004) 219.

^[96] S. Wang, L. Du, L. Wang, H. Zhuang, *Anal. Sci.* 20 (2004) 315.

representa una alternativa simple, económica y sensible para cuantificar una gran variedad de compuestos ^[97]. Las aplicaciones analíticas de la CL en el análisis por inyección en flujo (FIA), cromatografía líquida e inmunoensayo hacen de esta técnica un campo de investigación muy interesante dentro del análisis químico, biológico, farmacéutico, biomédico, alimentario, control de calidad, entre otros ^[98]. Las tendencias más actuales en Química Analítica implican la aplicación de la CL como sistema de detección combinada con técnicas de análisis por inyección en flujo y técnicas separativas. De esta manera, se logra tener una selectividad y sensibilidad analíticas excelentes que permiten la resolución y cuantificación de varios analitos en mezclas relativamente complejas.

4.2.1.1 Fundamento y Mecanismos de la CL

La CL se define como la emisión de radiación electromagnética (normalmente en la región del visible o del infrarrojo cercano) generada durante el transcurso de una reacción química. En una reacción CL se genera un producto en un estado electrónico excitado que produce luz al volver al estado fundamental. Es por ello que para que se genere CL es necesario que la reacción produzca un exceso de energía, lo que es bastante frecuente, por ejemplo, en reacciones tipo rédox. Sin embargo, el hecho de que este exceso de energía se disipe con emisión

^[97] A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens, *Chemiluminescence in Analytical Chemistry*, Marcel Dekker, New York, 2001.

^[98] A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens, L. Cuadros-Rodríguez, F. Alés Barrero, J.M. Bosque-Sendra, L. Gámiz Gracia, *Current Organic Chemistry* 6 (2002) 2001.

quimioluminiscente depende en gran medida de la estructura molecular de los intermediarios o productos de reacción.

Como la intensidad de emisión es función de la concentración de las especies químicas implicadas en la reacción quimioluminiscente, las medidas de la intensidad de emisión pueden emplearse con fines analíticos. Dependiendo de la naturaleza del analito y de la reacción quimioluminiscente, el incremento o disminución de la intensidad de CL estará directamente relacionada con la concentración de analito.

En general, una reacción quimioluminiscente puede generarse mediante dos mecanismos básicos (Figura 4.2):

- ✓ *CL Directa*. En este caso dos reactivos, normalmente un sustrato y un oxidante, reaccionan para formar un producto o intermediario de la reacción electrónicamente excitado que a continuación se relaja hasta el estado fundamental con emisión de un fotón. El sustrato es el precursor quimioluminiscente que se convierte en la molécula excitada electrónicamente, responsable de la emisión de luz, o bien actúa para transferir la energía en la CL indirecta. A veces, en estas reacciones se requiere un catalizador (enzima o ión metálico) que disminuya la energía de activación para aumentar el rendimiento cuántico de la reacción ^[99]. Por otro lado, en ocasiones pueden ser necesarios determinados cofactores para convertir uno o más de los sustratos en una forma capaz de reaccionar e interaccionar con el catalizador, o bien para proporcionar

^[99] Y. Fuster Mestre, B.S. Fernández Band, L. Lahuerta Zamora, J. Martínez Calatayud, *Analyst* 124 (1999) 413.

un grupo saliente eficaz cuando se requiere un marcador para producir el emisor excitado.

✓ *CL Indirecta*. La CL indirecta o sensibilizada se basa en un proceso de transferencia de energía de la especie excitada a un fluoróforo. Los fluoróforos son especies químicas que absorben la energía transferida excitándose. Luego éstas se relajan liberando el exceso de energía en forma de radiación.

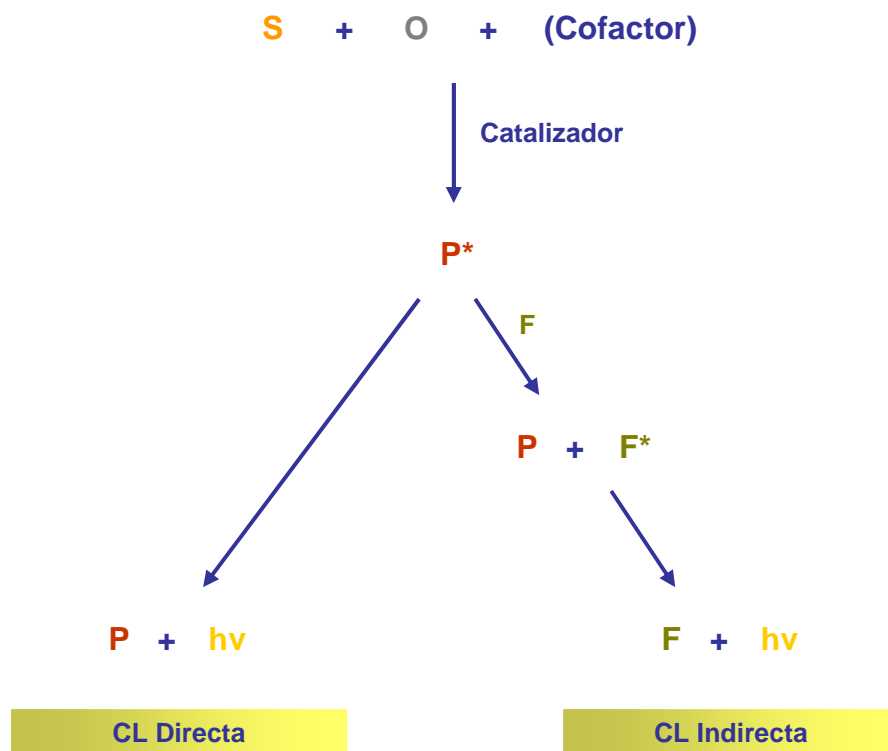


Figura 4.2. Mecanismos de la CL directa e indirecta. S: sustrato; O: oxidante; P*: producto o intermediario electrónicamente excitado; P: producto; F: fluoróforo.

El ejemplo más conocido en CL directa es la oxidación del luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona) en medio alcalino, para producir el ión 3-aminofalato excitado (Figura 4.3). Pueden utilizarse varios oxidantes, tales como permanganato,

hipoclorito, yodo, peróxido de hidrógeno, etc. La reacción es catalizada por iones metálicos (Fe(II), Cu(II), Co(II), entre otros), ferricianuro o algunos metalocomplejos (hemina, hemoglobina y peroxidasas).

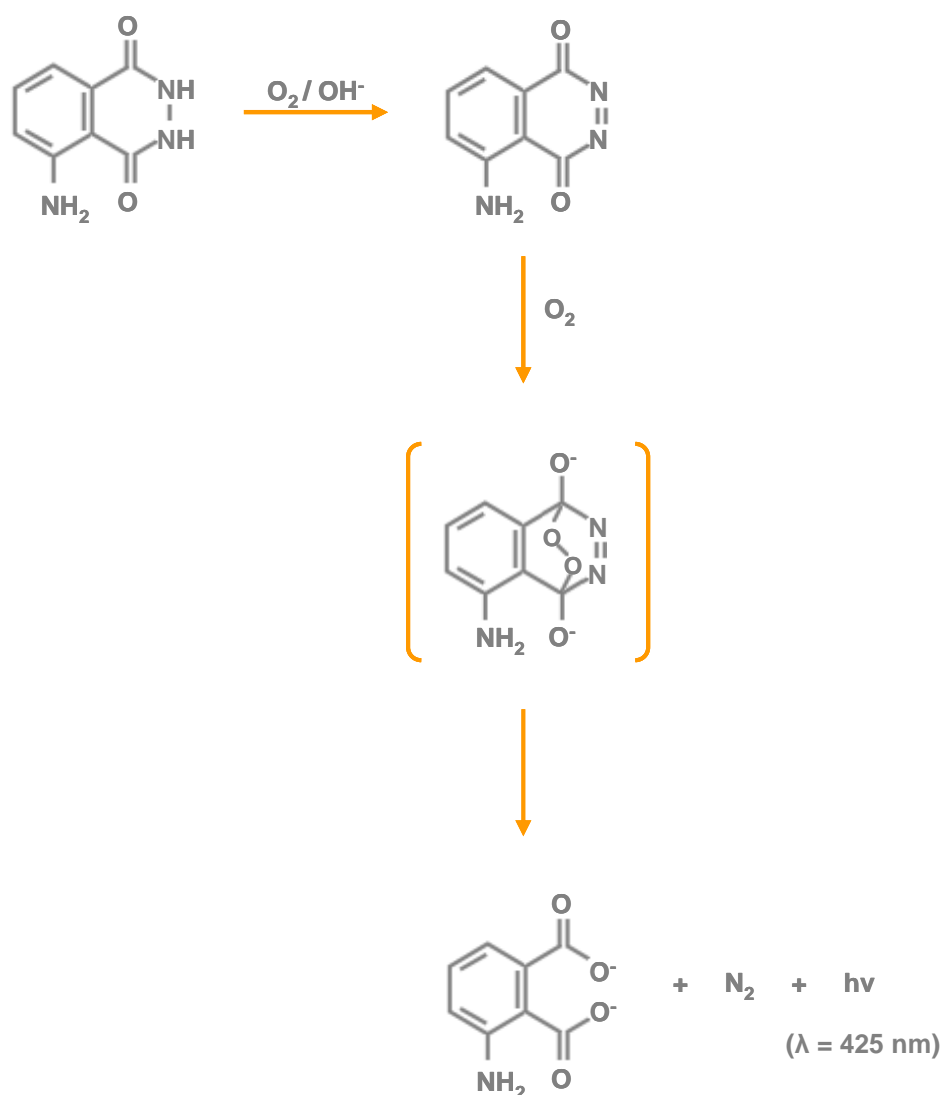


Figura 4.3. Mecanismo propuesto para la oxidación del luminol en medio alcalino.

Esta reacción ha sido aplicada en la determinación de iones metálicos (que actúan como catalizador), enzimas (peroxidasas, compuestos hemáticos, etc),

ciertos oxidantes e inhibidores o sustancias que son fácilmente oxidables y que son determinadas indirectamente por la disminución de emisión quimioluminiscente.

También ciertos fármacos cuya presencia inhibe o exalta la emisión del luminol han sido cuantificados mediante esta metodología. En el primer caso se destaca la determinación de paracetamol ^[100] y oximetazolina ^[101], y en el segundo caso la determinación de ácido clavulánico y sulbactam ^[102] y de tiopronina ^[103].

4.2.1.2 Instrumentación

Una ventaja de la CL es que permite emplear una instrumentación bastante sencilla ya que el sistema óptico no requiere fuente externa de excitación. Además, la ausencia de altos niveles de luz de fondo (presentes en espectrofotometría y fluorimetría) reduce el ruido y permite mejorar los límites de detección. La instrumentación para medidas de CL varía desde sistemas muy simples, como un fluorímetro (con la fuente de excitación apagada) hasta instrumentación más compleja. En todos los casos se requiere una celda de reacción, un compartimento cerrado a la luz, un dispositivo de inyección y mezcla de reactivos y/o de muestra, un detector de fotones y un sistema de adquisición de la señal analítica. En el compartimento cerrado se coloca la celda de reacción (un tubo de ensayo, un microplato, una celda de flujo, una cámara de mezclado, etc.) con el objeto que toda

^[100] D. Easwaramoorthy, Y. Yueh-Chuan, H. Hsuan-Jung, *Anal. Chim. Acta* 439 (2001) 95.

^[101] M.P. Bueno Vargas, A.M. García-Campaña, J.M. Bosque Sendra, X. Zhang, *Luminescence* 17 (2002) 204.

^[102] F.A. Aly, A.A. Nawal, A.A. Abdulrahman, *Anal. Chim. Acta* 414 (2000) 15.

^[103] J. Lu, L. Choiwan, S. Yagisawa, K. Ohta, M. Kai, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 1033.

la radiación emitida en la reacción sea captada por el detector. Este compartimento debe estar sellado a la luz ambiental, para evitar posibles interferencias, y se debe colocar tan cerca como sea posible del detector para conseguir una máxima eficiencia. La función del compartimento es mantener la mezcla de reactivo y muestra a una temperatura adecuada y en completa oscuridad a fin de aislar el detector de la luz externa.

Una vez mezclados los reactivos y la muestra comienza la reacción quimioluminiscente y la intensidad de la emisión que se está produciendo disminuye a la vez que los reactantes se van consumiendo. Esto supone que el carácter de la emisión quimioluminiscente es transitorio y que la escala de tiempo depende de la reacción en cuestión, que va de un corto flash a una emisión algo más prolongada. Este hecho debe tenerse en cuenta para la selección del sistema más conveniente para la incorporación de los reactivos.

La metodología FB podría ser una excelente alternativa para la automatización de reacciones quimioluminiscentes. En un sistema FB el ingreso de reactivos y/o de muestra a la cámara de mezclado (CM) es perfectamente controlado y puede realizarse de forma secuencial o simultánea. A su vez, la CM, provista de una ventana de cuarzo, puede colocarse en el compartimento cerrado a la luz y muy cerca del detector. La señal puede registrarse a un tiempo perfectamente definido lo que mejora su reproducibilidad. La mezcla de los reactivos puede llevarse a cabo mediante un sistema de agitación en la CM y todas las operaciones del sistema pueden realizarse de manera completamente automática.

Independientemente del sistema seleccionado, debe tenerse en cuenta que el análisis por CL es dependiente de una serie de factores ambientales que deben ser controlados. También debe evaluarse la selectividad, ya que un reactivo quimioluminiscente puede reaccionar con más de un analito.

4.2.1.3 Factores que Influyen en la Emisión en CL

Las medidas de CL están fuertemente influenciadas por aquellos factores experimentales que afectan al rendimiento cuántico y a la velocidad de reacción.

Entre ellos tenemos:

- ✓ La estructura química del precursor quimioluminiscente.
- ✓ La naturaleza y concentración de otras sustancias que afectan el proceso de CL y que favorecen otros procesos competitivos no radiantes.
- ✓ El catalizador seleccionado.
- ✓ La presencia de iones metálicos, especialmente metales de transición implicados en el proceso de oxidación.
- ✓ La temperatura.
- ✓ pH y fuerza iónica.
- ✓ La polaridad del disolvente y la composición de la disolución.
- ✓ La presencia de aceptores de la energía transferida.

Como se comentó en la sección 3.2.2 las variables involucradas en un proceso analítico deben ser ajustadas para obtener una respuesta óptima. Es por ello que en

esta parte del trabajo de tesis se emplearon nuevamente las bases del diseño experimental, en particular la metodología propuesta por Box-Behnken ^[104], con el objeto de:

- ✓ Estimar los efectos que producen los cambios de las variables químicas y sus posibles interacciones.
- ✓ Describir una superficie de respuesta en la región experimental estudiada.
- ✓ Obtener las concentraciones óptimas de las variables químicas involucradas en la reacción quimioluminiscente.

4.2.2 Diseño Experimental Box- Behnken

El diseño Box-Behnken (DBB) es una clase de diseño experimental de segundo orden, basado en un diseño factorial incompleto de tres niveles. La [Figura 4.4](#) muestra un DBB para tres factores. El mismo puede interpretarse como tres planos, cada uno de los cuales consta de cuatro experimentos. En cada plano, dos variables conforman un diseño factorial completo de dos niveles mientras la variable restante esta nivelada a cero. Visto de otra forma, los puntos se localizan en la superficie de una esfera centrada en el origen de un sistema de coordenadas y tangencial al punto central de cada cara del cubo.

Comparado con otras clases de diseño experimental, el DBB presenta algunas ventajas:

- ✓ El estudio de tres variables requiere solamente de 13 experimentos

^[104] G.E.P. Box, D.W. Behnken, *Technometrics* 2 (1960) 455.

(incluyendo el punto central).

- ✓ Cada variable es estudiada en tres niveles, lo que puede resultar importante en determinadas situaciones experimentales.

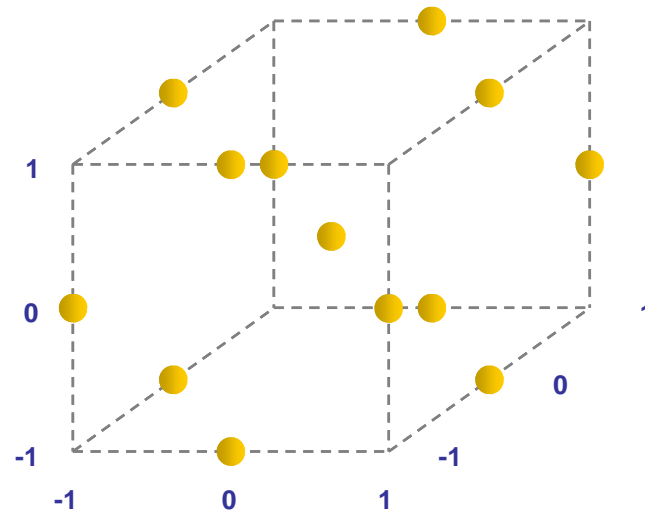


Figura 4.4. Diseño experimental Box-Behnken para tres variables. Cada variable puede ser estudiada en tres niveles (1, 0, -1).

En general, estas diferencias no son decisivas al momento de elegir un diseño experimental, por lo menos para este número de variables. Sin embargo, teniendo en cuenta que un DBB no incluye experimentos en los cuales todas las variables están al menor y/o al mayor nivel, lo hace útil si se quiere evitar realizar experimentos en condiciones extremas (vértices del cubo) los cuales pueden generar resultados no deseados o poco satisfactorios. Por lo contrario, este diseño no está indicado para situaciones en las cuales se precisa conocer las respuestas en los niveles extremos.

4.3 PARTE EXPERIMENTAL

4.3.1 Equipamiento y Programas Quimiométricos

- ✓ Espectrofluorímetro Aminco Bowman® Series 2.
- ✓ Bomba peristáltica Gilson modelo Minipuls 3.
- ✓ pHmetro Orion® modelo 710 A.
- ✓ Válvulas solenoides de tres vías NResearch.
- ✓ Accionador electrónico de válvulas (construido en el laboratorio).
- ✓ Cámara de mezclado/detección de Teflon® de 4 mL, con ventana de cuarzo (construida en el laboratorio).
- ✓ Tubos de línea de Teflon® de 0,8 mm de diámetro interno y tubos de bomba de Tygon® de 1,29 mm y 2,06 mm de diámetro interno.
- ✓ Programas quimiométricos Matlab® versión 6.0 y Statistica® versión 6.0.

4.3.2 Reactivos y Soluciones

Todas las soluciones se prepararon con agua ultra pura (18 mΩ) y todos los reactivos químicos que se utilizaron fueron de grado analítico.

- ✓ Solución patrón de luminol 0,04 mol L⁻¹, se preparó disolviendo 0,709 g de luminol (Fluka) en 100 mL de una solución de hidróxido de potasio 0,1 mol L⁻¹.

Las soluciones de trabajo fueron preparadas diariamente por dilución apropiada

de la solución patrón con solución de hidróxido de potasio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

- ✓ Solución patrón de hexacianoferrato de potasio (III) $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, se preparó disolviendo 33 mg de hexacianoferrato de potasio (III) (Merck) en 500 mL de agua. Las soluciones de trabajo fueron preparadas diariamente, por dilución apropiada de la solución patrón con agua.
- ✓ Solución de hidróxido de potasio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, se preparó disolviendo 56,11 g de hidróxido de potasio (Merck) en 1000 mL de agua.
- ✓ Soluciones patrón de clorhidrato de dopamina (Sigma), bitartrato de norepinefrina monohidratada (Sigma) y bitartrato de epinefrina (Sigma) de 2,90, 1,28 y $0,95 \text{ mg mL}^{-1}$ respectivamente, se prepararon en agua. Estas soluciones se protegieron de la luz y se conservaron a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Las soluciones de trabajo fueron preparadas por dilución apropiada de la solución patrón con agua.
- ✓ Muestras de preparaciones farmacéuticas de dopamina (Northia[®] y Fabra[®]), de norepinefrina (Biol[®] y Fioritina[®]) y de epinefrina (Lavimar[®] y Larjan[®]) fueron obtenidas en una farmacia local.

4.3.3 Metodología Analítica

4.3.3.1 Sistema FB

En la [Figura 4.5](#) se muestra un diagrama del sistema FB propuesto. Para este sistema se utilizaron cinco válvulas solenoides de tres vías: cuatro de las mismas, V_A , V_M , V_{LU} y V_{HE} , para dirigir agua, las soluciones de trabajo o muestra, luminol y hexacianoferrato de potasio (III) hacia la cámara de mezclado (CM),

respectivamente. La sexta válvula, V_{CMA} , se utilizó para dirigir la mezcla proveniente de la CM o agua hacia el desecho.

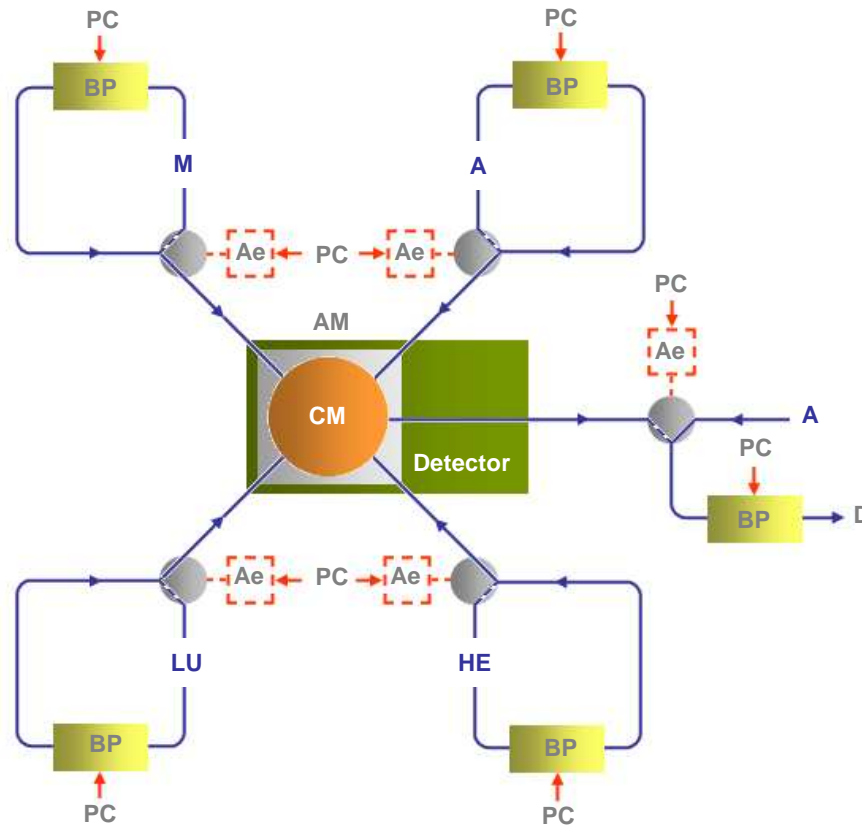


Figura 4.5. Diagrama del sistema FB propuesto. A: agua; HE: hexacianoferrato de potasio (III); LU: luminol; M: muestra; Ae: accionador electrónico; AM: agitador magnético; BP: bomba peristáltica; CM: cámara de mezclado; D: desecho; PC: computadora. Las válvulas solenoides están representadas por círculos grises. Las flechas azules indican la dirección de desplazamiento de los fluidos. Las flechas rojas representan la interfase paralela de comunicación a la computadora.

En la [Figura 4.6](#) se muestra un esquema de la CM con su correspondiente ventana de cuarzo colocada frente al detector.

Para controlar la bomba peristáltica y las válvulas solenoides se utilizó una computadora con procesador Pentium (166 MHz). La conexión se realizó a través

de a una interfase paralela. La misma computadora se utilizó para la recepción y posterior tratamiento de los datos.

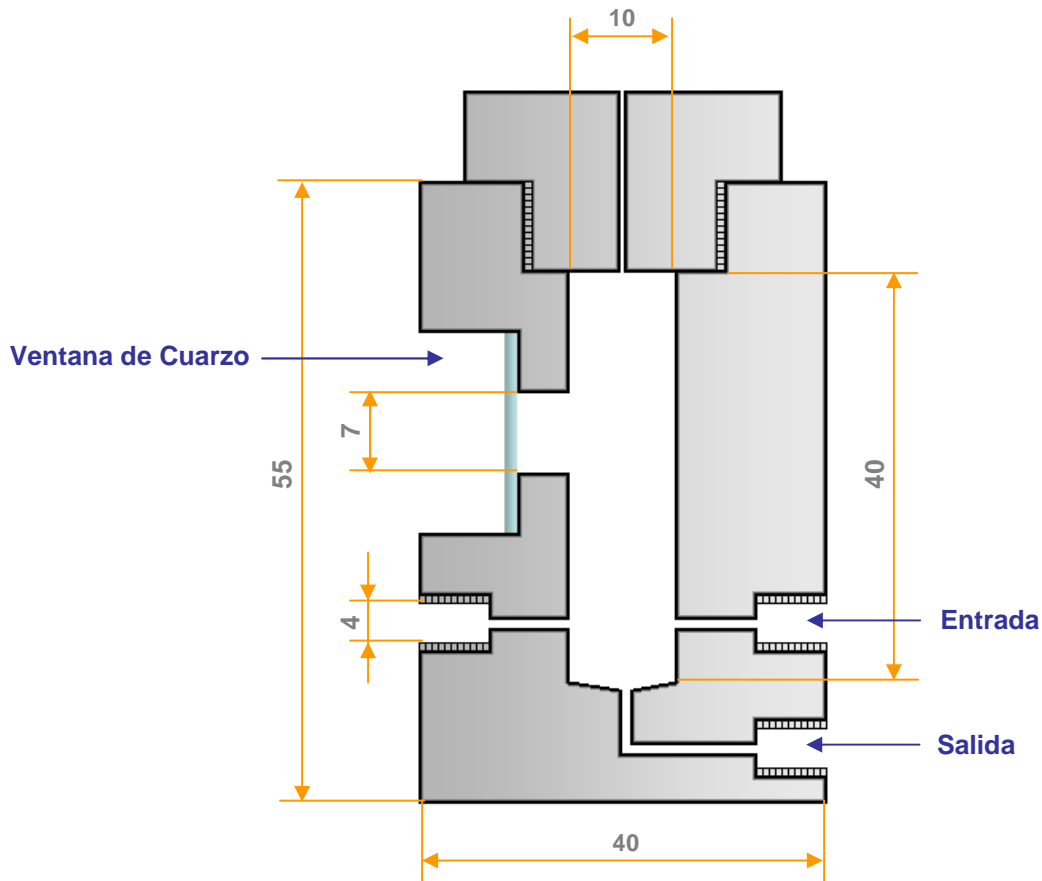


Figura 4.6. Esquema de la cámara de mezclado (CM) utilizada en el sistema FB propuesto. Las dimensiones están expresadas en mm.

El programa de comando fue desarrollado en lenguaje Delphi®, versión 7.0. La

Figura 4.7 muestra la ventana de diálogo diseñada para comandar el sistema.

El incremento de la señal eléctrica proveniente de la PC, necesario para accionar las válvulas, se consiguió a través de un accionador electrónico (Ae).

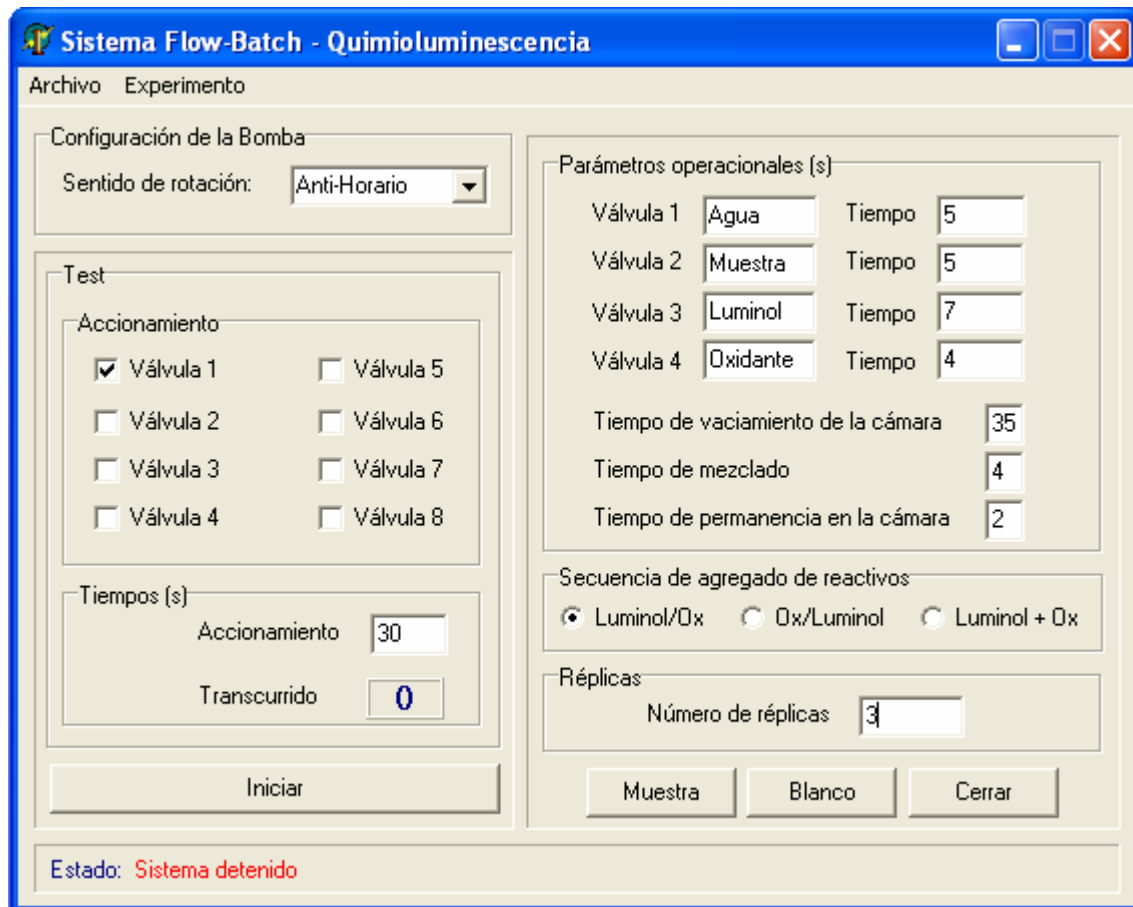


Figura 4.7. Ventana de diálogo diseñada para comandar el sistema FB propuesto.

4.3.3.2 Procedimiento Desarrollado

Como se comentó en la sección 3.6.3.4 un paso inherente a la implementación de la metodología FB es la obtención de factores de corrección debido a la diferencia de caudales en las distintas líneas. Como puede verse en la [Tabla 4.1](#), en nuestro sistema se encontraron diferencias por lo que fue necesaria una corrección. La misma se realizó una vez más siguiendo el procedimiento descrito por Almeida y col. [16].

En la [Tabla 4.1](#) también se muestra el esquema operativo del sistema FB

propuesto.

Tabla 4.1. Esquema operativo del sistema FB propuesto.

ETAPA OPERATIVA	VÁLVULA SOLENOIDE				
	V _A	V _M	V _{LU}	V _{HE}	V _{CM/A}
Caudal (mL min ⁻¹)	8,4	8,4	7,2	12,0	12,0
Tiempo de accionamiento (s)					
Llenado de canales	2	2	2	2	2
Lavado					
Llenado de la CM	30	0	0	0	0
Vaciado de la CM	0	0	0	0	35
Blanco	10	0	7	4	35
Soluciones estándar	0-10	0-10	7	4	35
Muestras	5	5	7	4	35

V_A: válvula agua; V_M: válvula soluciones de trabajo o muestra; V_{LU}: válvula luminol; V_{HE}: válvula oxidante; V_{CM/A}: válvula CM/agua.

En este esquema se detallan los tiempos de accionamiento de las válvulas solenoides utilizados para llevar a cabo los distintos pasos del procedimiento que se describen a continuación:

- ✓ *Llenado de Canales.* En primer lugar, se llenaron todos los canales con sus respectivas soluciones. Las válvulas permanecieron desactivadas lo que permitió que los fluidos retornen a sus respectivos sitios de partida. Luego, cada válvula fue accionada durante un intervalo de 2 s. De esta forma, se consiguió llenar los canales en los tramos que van desde las válvulas V_A, V_M, V_{LU} y V_{HE} hasta la CM (Figura 4.5). Finalmente, se accionó la válvula V_{CM/A} durante 4 s y el exceso de soluciones dentro de la CM fue dirigido hacia el desecho. Esta operación

demandó un tiempo total de 6 s y se realizó siempre que se cambió una solución en un canal determinado.

✓ *Lavado de la CM.* El lavado de la CM se llevó a cabo accionando la válvula V_A durante 30 s. Posteriormente, se accionó la válvula V_{CMA} durante 35 s con el objeto de evacuar el líquido de lavado. Se realizó el lavado de la CM entre medida y medida.

✓ *Preparación del Blanco.* Se activaron secuencialmente las válvulas V_A , V_{LU} y V_{HE} durante un tiempo apropiado (t_A , t_{LU} y t_{HE}). Por lo tanto, agua, luminol y oxidante se dirigieron hacia la CM y se registró la señal generada que fue medida como altura de pico.

✓ *Preparación de las Soluciones Estándar.* Cuando en la CM están presentes DOP, NOR o EPI se produce una disminución en la intensidad de la señal quimioluminiscente que es proporcional a la concentración de estos compuestos. Por eso, se accionaron secuencialmente las válvulas V_A y V_M durante un tiempo definido (t_A y t_M). Con esto, alícuotas de agua y DOP, NOR o EPI se dirigieron hacia la CM. La mezcla resultante se homogeneizó por agitación durante 4 s. Luego de este período se accionó la válvula V_{LU} durante un tiempo t_{LU} . La reacción comenzó cuando se accionó la válvula V_{HE} por un tiempo t_{HE} . De esta manera, se registró la señal que se encontraba parcialmente inhibida por la presencia de DOP, NOR o EPI. La mezcla resultante permaneció 2 s en la CM y pasado este tiempo se dirigió al desecho luego de accionar la válvula V_{CMA} durante 30 s. Este procedimiento se repitió para la preparación de cada solución

estándar, debiendo variar solamente los tiempos t_A y t_M .

✓ *Preparación de las Muestras.* Para obtener las señales correspondientes a las muestras se procedió de igual forma que en el punto anterior, solo que se reemplazaron las soluciones de trabajo de DOP, NOR o EPI por diluciones adecuadas de las muestras de interés.

Es importante mencionar que el volumen total adicionado a la cámara debe permanecer constante para cada solución estándar o muestra preparada en el sistema. Por eso, t_{LU} y t_{HE} permanecieron siempre constantes, y si t_M aumentó, se disminuyó t_A y viceversa.

4.3.3.3 Preparación de las Muestras

Para cada muestra se diluyó con agua el contenido de 4 ampollas. La solución obtenida se incorporó en el sistema para su correspondiente análisis.

4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1 Optimización de Parámetros FB

Se estudiaron los volúmenes de reactivos y de muestra a introducir en la CM, y el tiempo de agitación en la misma. La optimización se realizó por el método univariado y el criterio aplicado fue un compromiso entre sensibilidad y reproducibilidad de la señal analítica. Los resultados se muestran en la [Tabla 4.2](#).

Tabla 4.2. Valores óptimos para los parámetros FB.

PARÁMETRO FB	INTERVALO ESTUDIADO	VALOR ÓPTIMO
Volumen (mL)		
Agua	0,5-1,0	0,70
Muestra	0,5-1,0	0,70
Luminol	0,5-1,0	0,80
Oxidante	0,5-1,0	0,80
Tiempo (s)		
Mezclado	2-10	4

Una variable crítica fue el orden de agregado de los reactivos en la CM. Se analizaron tres combinaciones diferentes: LU/HE, HE/LU y LU-HE simultáneamente. El orden con el que se obtuvo la mejor señal analítica fue LU/HE. También se obtuvo una significativa mejora de la señal cuando se hicieron reaccionar rápidamente luminol y oxidante. Por eso, teniendo en cuenta el orden de

agregado, el caudal del canal de HE (0,20 mL min⁻¹) fue mayor al del canal de LU (0,12 mL min⁻¹). Otra forma de producir un rápido y efectivo contacto entre el luminol y el oxidante fue aumentando la velocidad de agitación. Se evaluó este efecto resultando óptima una velocidad de 500 rpm para el agitador magnético utilizado.

La CM permitió un eficiente contacto de todos los componentes de la reacción. Por otro lado, el sistema FB permitió la preparación automática de los testigos, lo que redujo el tiempo de análisis y el consumo de las soluciones de trabajo de DOP, NOR y EPI. La frecuencia de muestreo fue de 30 h⁻¹.

4.4.2 Optimización de las Variables Químicas

Las variables estudiadas fueron las concentraciones de luminol, hexacianoferrato de potasio (III) e hidróxido de potasio, en tres niveles: bajo (-1), medio (0) y alto (+1). Se llevaron a cabo 15 experimentos (incluyendo tres réplicas del punto central) por duplicado ($n = 30$). La selección de los intervalos de estudio para cada variable se basó en la influencia de la misma en la señal quimioluminiscente. Las respuestas instrumentales correspondientes a cada uno de los experimentos del diseño se ajustaron al siguiente polinomio de primer orden:

$$R_{(LU, HE, KOH)} = 13,55 [LU] + 21,58 [HE] + 7,10 [KOH] + 6,44 [LU*HE] + 4,26 [HE*KOH] + 43,84$$

$$(\pm 0,049) \quad (\pm 0,049) \quad (\pm 0,049) \quad (\pm 0,70) \quad (\pm 0,70) \quad (\pm 0,81)$$

donde R representa la variable independiente (respuesta) y LU, HE y KOH son las variables químicas estudiadas. En este modelo de ajuste se removieron todos los efectos no significativos.

Para evaluar la calidad de ajuste se llevo a cabo un análisis de la varianza (ANOVA). El resultado de este análisis se muestra en la [Tabla 4.3](#). Para el modelo lineal propuesto no se observa evidencia de falta de ajuste, ya que la relación entre la media cuadrática de la falta de ajuste y la media cuadrática del error puro (MS_{lof}/MS_{pe}) fue 2,91, un valor menor que el valor $F_{3,17}$ crítico (3,20 para un 95 % de confianza). Por otro lado, la relación entre la media cuadrática de la regresión y la media cuadrática de los residuos (MS_R/MS_r) fue 332,9, un valor mucho mayor que el valor $F_{9,20}$ crítico (2,39 para un 95 % de confianza). Esto indica que el modelo de ajuste propuesto es apropiado para el conjunto de datos analizado.

Tabla 4.3. Resultados del ANOVA para el modelo de ajuste obtenido para las tres variables estudiadas.

FUENTE DE VARIACIÓN	SS	GL	MS
Regresión	11708	9	1300,9
Residuos	78,1	20	3,91
Falta de Ajuste	26,5	3	8,84
Error Puro	51,6	17	3,04
Total	11786,1	29	
Varianza Explicada (%)	99,34		
Máximo de Varianza Explicable (%)	99,56		

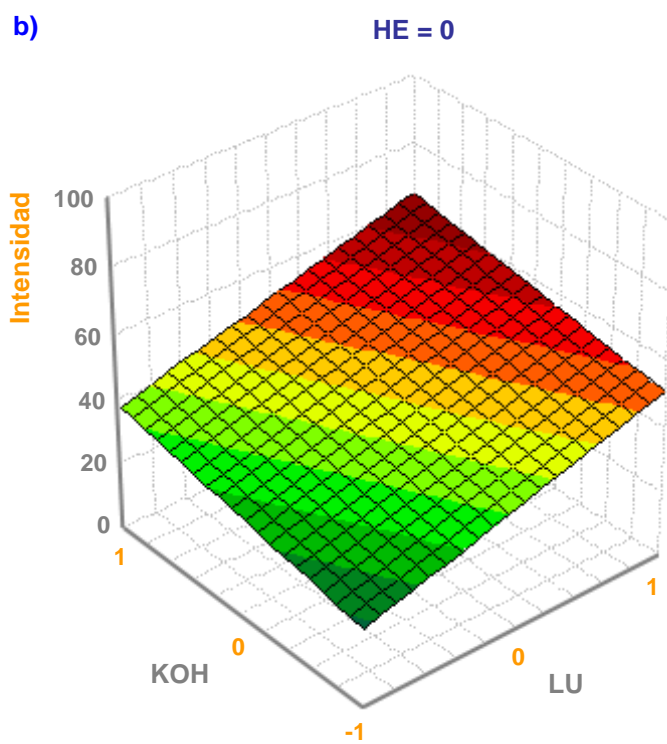
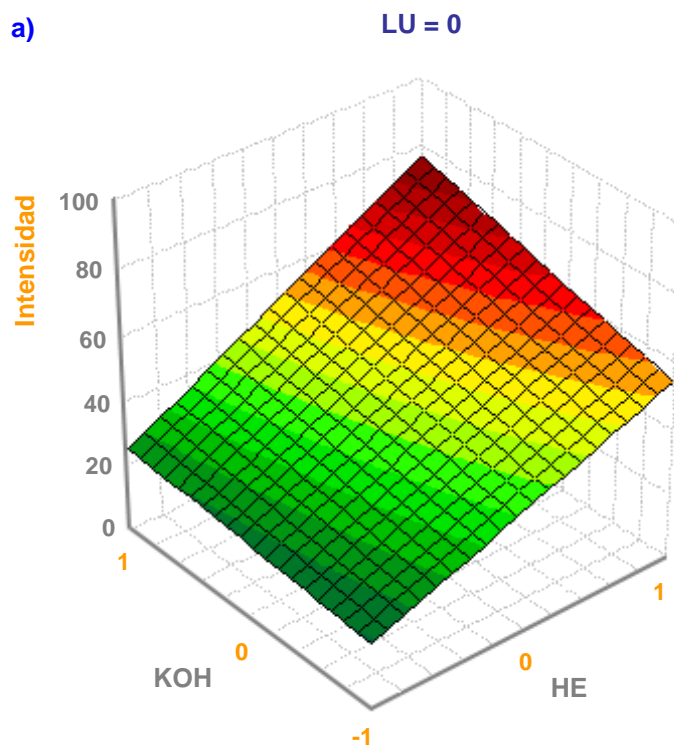
SS: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; MS: media cuadrática.

La [Figura 4.8](#) muestra las superficies de respuesta obtenidas con el modelo de

ajuste. Como puede observarse, los valores óptimos para las tres variables analizadas (concentraciones de LU, HE y KOH) estuvieron fuera del dominio experimental. Nalewajko y col. ^[95] propusieron un posible mecanismo para el efecto inhibitorio que ejerce la dopamina sobre un sistema quimioluminiscente de luminol-hexacianoferrato de potasio (III). La dopamina reacciona con el hexacianoferrato de potasio (III) consumiendo parte de este oxidante, lo que hace que la intensidad de la quimioluminiscencia disminuya debido a que hay menos oxidante disponible para reaccionar con el luminol. De acuerdo a nuestras experiencias, una concentración de oxidante del orden de 10^{-7} mol L⁻¹ puede ser parcialmente consumida (y consecuentemente la intensidad de la señal parcialmente inhibida) por una muestra con una concentración del orden de 10^{-8} mol L⁻¹ de DOP, 10^{-8} mol L⁻¹ de NOR o 10^{-7} mol L⁻¹ de EPI. Por lo tanto, se pueden obtener bajos límites de detección trabajando con una baja concentración de oxidante. Cuando se utilizaron concentraciones de muestra mayores que las citadas precedentemente se consumió todo el oxidante presente, lo que resultó en la inhibición total de la señal analítica. Por otro lado, concentraciones de HE mas bajas que $6,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ resultaron en una disminución significativa de la señal analítica. En conclusión, la concentración óptima seleccionada para HE se estableció como un compromiso entre un bajo límite de detección y una apropiada señal analítica ([Tabla 4.4](#)).

Por último, con respecto a LU y KOH, cuando se utilizaron concentraciones mayores que 6×10^{-4} mol L⁻¹ y $1,0$ mol L⁻¹ respectivamente, se generaron señales poco reproducibles. Por eso, los valores presentados en la [Tabla 4.4](#) se

consideraron apropiados para los propósitos de este estudio.



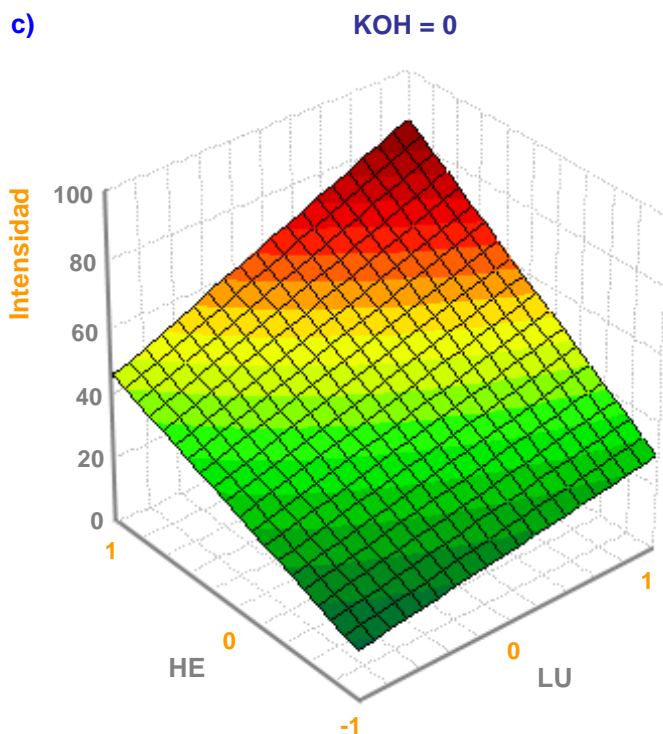


Figura 4.8. Superficies de respuesta obtenidas a partir del modelo de ajuste cuando: a) $[LU] = 4,0E^{-4}$ M; b) $[HE] = 4,0E^{-7}$ M; c) $[KOH] = 0,8$ M. Estos valores de concentración corresponden al nivel medio (0 en numeración codificada).

Tabla 4.4. Niveles y valores óptimos de las variables químicas analizadas.

VARIABLE	NIVEL			VALOR ÓPTIMO
	-1	0	1	
LU (mol L ⁻¹)	2,0E ⁻⁴	4,0E ⁻⁴	6,0E ⁻⁴	6,0E ⁻⁴
HE (mol L ⁻¹)	2,0E ⁻⁷	4,0E ⁻⁷	6,0E ⁻⁷	6,0E ⁻⁷
KOH (mol L ⁻¹)	0,6	0,8	1,0	1,0

En conclusión, el criterio de optimización fue la máxima señal y reproducibilidad utilizando la menor cantidad posible de oxidante.

4.4.3 Parámetros Analíticos

Una vez establecidas las condiciones experimentales se obtuvieron los modelos de calibración para cada analito utilizando regresión lineal univariada (ULR). En la [Figura 4.9](#) se muestran, para cada analito, las señales de CL en función del tiempo correspondientes a cada solución testigo preparada de forma automática en el sistema FB. También se muestran las curvas de calibrado obtenidas a partir de dichas señales. Los parámetros estadísticos se detallan en la [Tabla 4.5](#).

La repetibilidad, expresada como la desviación estándar relativa (RSD) de la altura de pico, se calculó a partir de las pendientes de tres curvas de calibrado ([Tabla 4.5](#)) y de nueve medidas independientes de una serie de estándares de DOP, NOR y EPI ([Tabla 4.6](#)). La reproducibilidad, también expresada como el RSD de la altura de pico, se calculó a partir de las pendientes de tres curvas de calibrado ([Tabla 4.5](#)) y de tres medidas independientes de una serie de estándares de DOP, NOR y EPI ([Tabla 4.6](#)) obtenidas en tres días diferentes. En todos los casos los resultados fueron satisfactorios, por lo tanto queda comprobada la precisión del método propuesto.

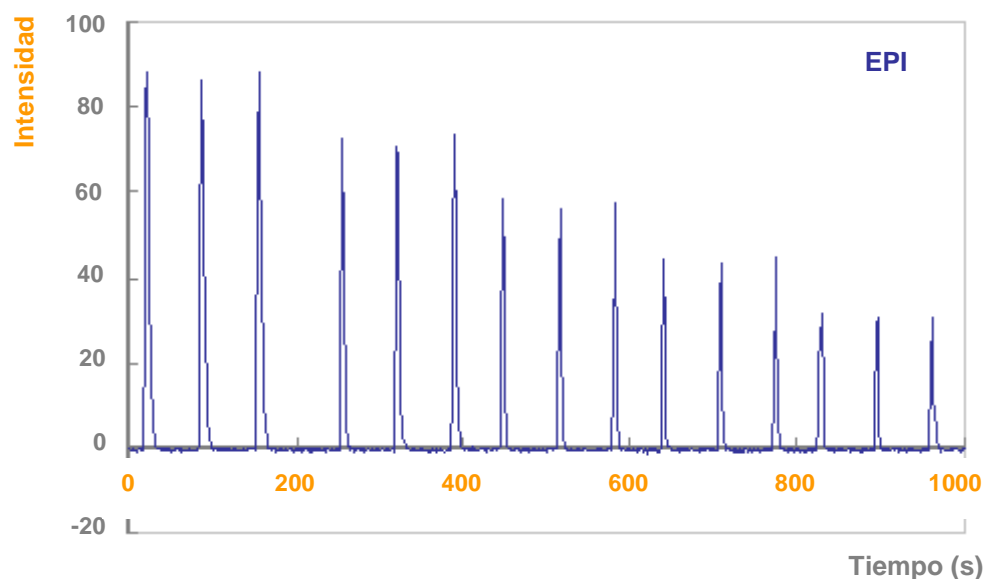
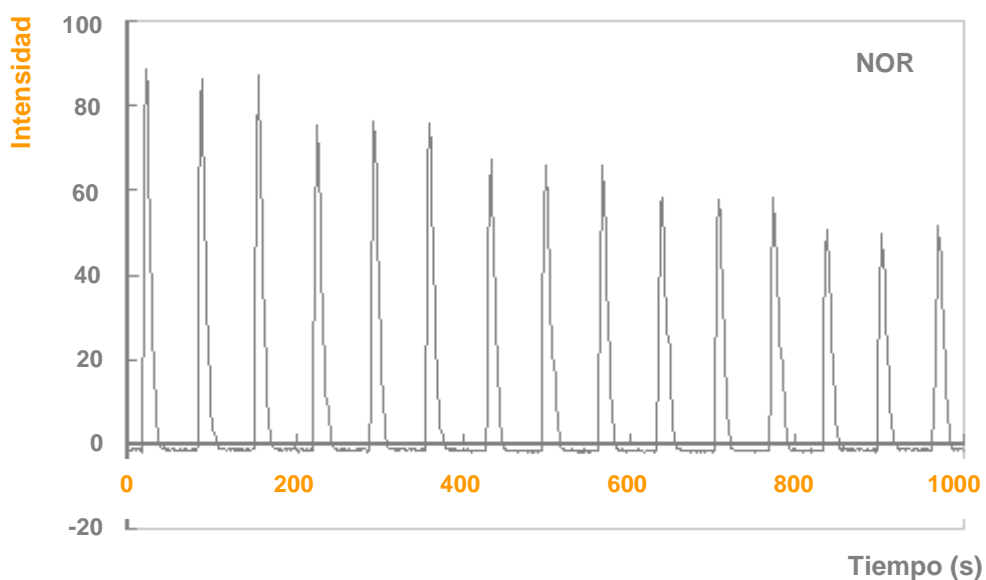
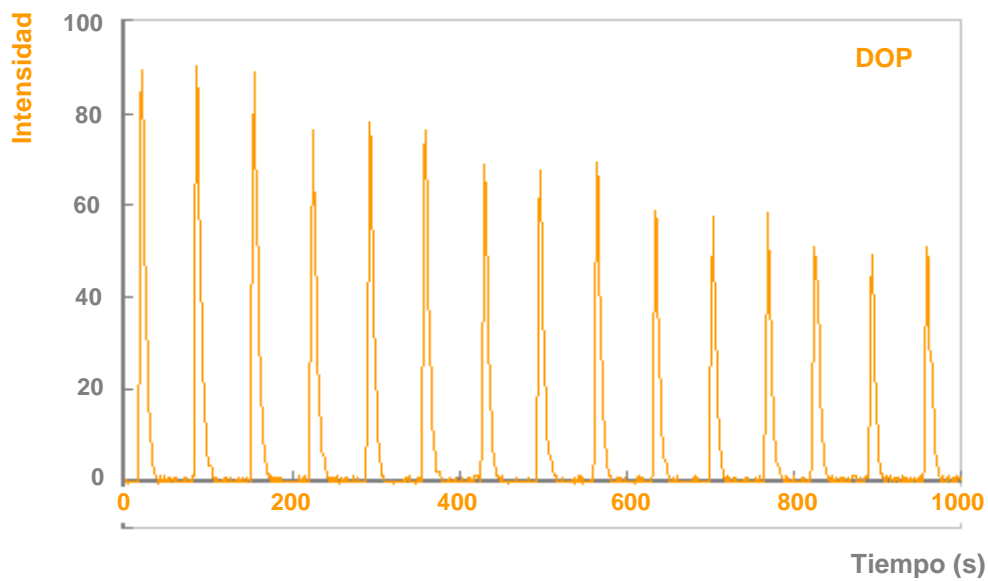
4.4.4 Estudio de Interferentes

Se estudio el efecto de algunos excipientes frecuentemente encontrados en los preparados analizados: cloruro de sodio, bisulfito de sodio (agente estabilizador) y

ácido cítrico-citrato de sodio (regulador del pH). Los mismos fueron agregados a soluciones estándar de DOP (13,4 ng mL⁻¹), NOR (7,6 ng mL⁻¹) y EPI (24,5 ng mL⁻¹) en cantidades similares a las presentes en las preparaciones analizadas. En todos los casos la variación de la señal fue menor al 5 % respecto de las soluciones puras. Por otro lado, se debería considerar la posibilidad de que las tres catecolaminas puedan interferir entre ellas. Sin embargo, dado que los usos terapéuticos de los principios activos analizados son muy diferentes entre si, solo una catecolamina esta presente por preparado farmacéutico.

4.4.5 Aplicación a Muestras Reales

El método propuesto fue utilizado para la determinación de dopamina, norepinefrina y epinefrina en preparaciones farmacéuticas comerciales. La [Tabla 4.7](#) muestra los resultados luego de aplicar el método propuesto y el de referencia (HPLC) [7] a las distintas muestras en estudio. Como puede verse, las concentraciones obtenidas por el método FB son altamente concordantes con las obtenidas por HPLC, para todas las muestras analizadas. Por otro lado, de acuerdo a lo obtenido por ambos métodos, todas las muestras cumplieron con los requerimientos de la farmacopea (excepto Northia de 100 mg cuando fue analizada por FBA).



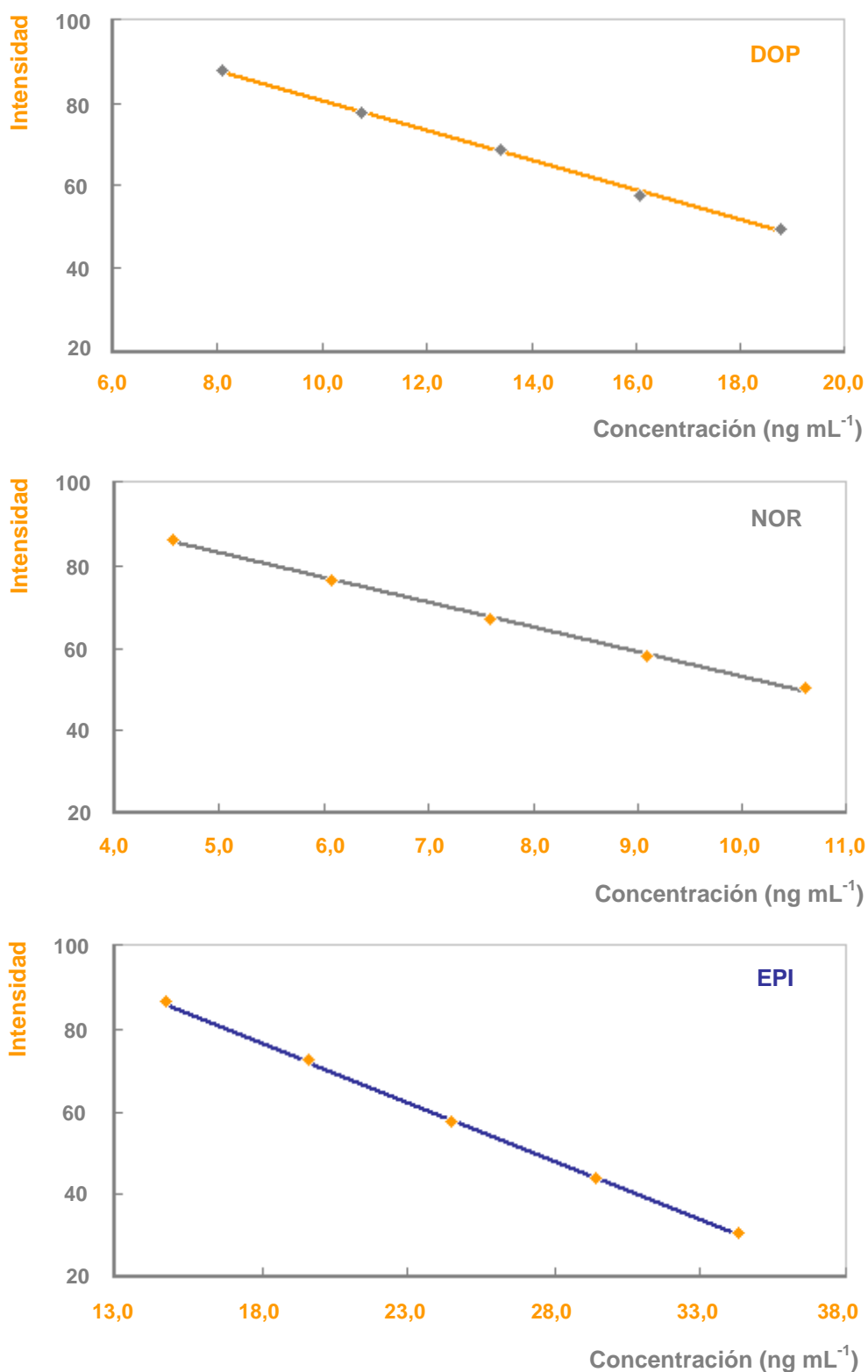


Figura 4.9. Gráficos de intensidad de CL vs. tiempo (tres primeros arriba) y curvas de calibrado (tres siguientes abajo) correspondientes a cada analito.

Tabla 4.5. Parámetros estadísticos correspondientes a los modelos de regresión obtenidos para los tres analitos.

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	ANALITO		
	DOP	NOR	EPI
Calibración			
n^a		5	
IC (ng mL ⁻¹)	8,0-18,8	4,5-10,6	14,7-34,3
Ordenada	116,7 ± 1,3	112,8 ± 1,2	126,9 ± 1,2
Pendiente	-3,615 ± 0,096	-5,966 ± 0,153	-2,810 ± 0,045
R ²	0,9979	0,9980	0,9995
Figuras de Mérito			
Límite de Detección (ng mL ⁻¹)	2,1	1,1	3,3
Límite de Cuantificación (ng mL ⁻¹)	6,4	3,3	9,9
Precisión			
Repetibilidad (RSD %, $n=3$)	3,9	4,0	3,3
Reproducibilidad (RSD %, $n=3, k=3$)	5,5	3,6	3,5

IC: intervalo de concentración. k : número de días.

^a Niveles de concentración. Cada nivel se realizó por triplicado.

Tabla 4.6. Precisión del método FB propuesto.

ANALITO	ESTÁNDAR	REPETIBILIDAD	REPRODUCIBILIDAD
	ng mL ⁻¹	RSD (%), $n=9$	RSD (%), $n=3, k=3$
DOP	10,7	1,4	5,2
	13,4	2,2	6,0
	16,1	1,6	3,6
NOR	6,1	2,8	3,7
	7,6	3,5	3,5
	9,1	1,8	4,1
EPI	19,6	3,2	3,5
	24,5	1,2	5,2
	29,4	3,1	6,5

Tabla 4.7. Resultados del análisis de muestras reales y test “t” de significancia.

MÉTODO	DOP				NOR		EPI	
	Northia®	Fabra®	Northia®	Fabra®	Biol®	Fioritina®	Lavimar®	Larjan®
Nominal	100	100	200	200	4,0	4,0	1,00	1,00
HPLC	100 (1)	103 (1)	205 (2)	208 (2)	4,1 (0,1)	4,2 (0,1)	0,92 (0,01)	0,92 (0,01)
FB	94 (1)	103 (1)	204 (3)	203 (4)	4,2 (0,1)	4,2 (0,1)	0,97 (0,03)	0,93 (0,01)
Criterio Aceptado ^a (%)		95-105			90-115		90-115	
t calculado ^b		1,16			2,83		2,41	
t crítico ^c		2,36			3,18		3,18	
n		8			4		4	

Los valores están expresados en mg por ampolla. Entre paréntesis se expresa la desviación estándar. Las muestras fueron analizadas por triplicado.

^a Según USP 29^[7].

^b Valor de HPLC vs. método FB.

^c Valor de “t” tabulado para un límite de confianza del 95 %.

4.5 CONCLUSIONES PARCIALES

La determinación de dopamina, norepinefrina y epinefrina en preparaciones farmacéuticas es factible por medio de un sistema FB con detección quimioluminiscente. La alta sensibilidad del método propuesto permite la cuantificación de estos analitos en niveles ultra-traza (ng mL^{-1}).

La posibilidad de poder ubicar la CM muy cerca del detector mejoró la señal analítica (altura y ancho de los picos) y por lo tanto la sensibilidad.

El sistema permitió preparar los testigos de forma completamente automática lo que disminuyó el tiempo de análisis y el consumo de reactivos y soluciones de trabajo.

El método propuesto presenta exactitud y precisión aceptables.

El diseño del sistema es simple y muy accesible para la mayoría de los laboratorios de rutina.

Capítulo 5



CONCLUSIONES

GENERALES

Las conclusiones que se extraen de este trabajo de investigación son las siguientes:

- ✓ Se desarrollaron métodos analíticos automáticos para la determinación de principios activos en fármacos.
- ✓ Levodopa y Carbidopa son compuestos que se encuentran en las preparaciones farmacéuticas con una relación de concentraciones muy diferentes entre sí. Se han desarrollado dos métodos analíticos para la cuantificación simultánea de ambos analitos. Estos métodos se basan en la reacción de oxidación de LVD y CBD en presencia de la enzima PFO. Los productos de reacción obtenidos se detectaron espectrofotométricamente. Se propone un sistema de extracción de la enzima simple y económico, a partir de productos naturales.
- ✓ El inconveniente debido a la superposición espectral de los productos de la oxidación fue solucionado mediante la aplicación de técnicas multivariadas. Así se desarrolló un método FIA de flujo detenido empleando PLS-1 para el análisis de los datos. El método propuesto y validado por un método de recuperación resultó simple, rápido y de bajo costo.
- ✓ El segundo método analítico se automatizó empleando la metodología FB. Con este sistema se logró preparar de forma automática los conjuntos de calibración y validación, todo esto influye en el menor consumo de tiempo y de reactivos. Se emplearon las técnicas de PLS y MLR-SPA para el análisis de los

datos y los resultados obtenidos fueron satisfactorios en ambos casos. El método fue validado por contraste con un método oficial.

✓ Se desarrolló e implementó un método analítico para la determinación de Dopamina, Noradrenalina y Epinefrina en fármacos. Se utilizó la metodología FB para automatizar el sistema. El mezclado de las soluciones y la detección quimioluminiscente correspondiente se realizaron en una cámara de teflón con ventana de cuarzo, diseñada en el laboratorio. El método propuesto y validado por un método oficial resultó simple, rápido, sensible y de bajo costo.

✓ En todos los métodos propuestos, la generación de residuos contaminantes fue mínima, lo que se traduce en un beneficio para el medio ambiente.

Es importante destacar que en un sistema de control de calidad de medicamentos se debe lograr proteger a los consumidores de los riesgos que representa la presencia en el mercado de medicamentos ineficaces, nocivos o de mala calidad. Esto puede traer consigo fracasos terapéuticos, agravamiento de las enfermedades, fármaco resistencia y, en ocasiones, la muerte de los pacientes. Tanto los laboratorios farmacéuticos privados como oficiales requieren métodos eficaces que permitan obtener resultados confiables de manera rápida.

Dado que la modernización de los métodos oficiales es un aspecto de continuo desarrollo e investigación, los métodos desarrollados resultan una interesante alternativa para ser propuestos al ente regulador nacional correspondiente (ANMAT) o bien a laboratorios privados ya sean de control o producción, de manera de poder

lograr una futura transferencia tecnológica al ser implementados como métodos de rutina. Esto es importante, ya que los métodos analíticos oficiales, en general HPLC, resultan laboriosos, no permiten obtener resultados con la rapidez necesaria y utilizan reactivos potencialmente tóxicos.

Apéndice



PRODUCTIVIDAD

DE LA TESIS

1. Trabajos Publicados

- ✓ *“PLS Regression in the Spectrophotometric Data for the Simultaneous Determination of Levodopa and Carbidopa in Pharmaceutical Preparations by using an Enzymatic Stopped-Flow FIA Technique”.*

M. Grünhut, M.E. Centurión, B.S. Fernández Band.

Analytical Letters, 40 (2007) 2016-2031.

- ✓ *“Flow-Batch Technique for the Simultaneous Enzymatic Determination of Levodopa and Carbidopa in Pharmaceuticals using PLS and Successive Projections Algorithm”.*

M. Grünhut, M.E. Centurión, W.D. Fragoso, L.F. Almeida, M.C.U. de Araújo, B.S.

Fernández Band.

Talanta, 75 (2008) 950-958.

2. Trabajos Enviados para su Publicación

- ✓ *“Flow-Batch Analyser with Chemiluminescence Detection for Determination of Three Catecholamines in Pharmaceutical Preparations”.*

M. Grünhut, V.L. Martins, M.E. Centurión, M.C.U. de Araújo, B.S. Fernández Band.

Analytical Letters, LANL-2009-0511.

3. Presentaciones a Congresos Nacionales

- ✓ *“Método Automatizado con Detección Quimioluminiscente para la Determinación de Diferentes Catecolaminas en Preparados Farmacéuticos”.*

II Congreso Iberoamericano y IV Congreso Argentino de Química Analítica.

Buenos Aires, Argentina. 27 al 30 de Agosto de 2007.

M. Grünhut, M.E. Centurión, B.S. Fernández Band.

4. Presentaciones a Congresos Internacionales

- ✓ *“Determinación Simultánea de Levodopa y Carbidopa en Fármacos utilizando Análisis por Inyección en Flujo y Calibración Multivariada”.*

13º Encuentro Nacional de Química Analítica. 1º Congresso Ibero-Americano de Química Analítica. Niteroi, Río de Janeiro, Brasil. 12 al 16 de Septiembre de 2005.

M. Grünhut, M.E. Centurión, B.S. Fernández Band.

- ✓ *“Determinación Espectrofotométrica Simultánea de Levodopa y Carbidopa utilizando un Sistema Flow-Batch y Calibración Multivariada”.*

VIII Encuentro de Química Analítica y Ambiental. Iquique, Chile. 16 al 19 de Octubre de 2006.

M. Grünhut, L.F. Almeida, M.E. Centurión, W.D. Fragoso, B.S. Fernández Band, M.C.U. de Araújo.

✓ *“Determinação Espectrofotométrica Simultânea de Levodopa e Carbidopa”.*

14º Encontro Nacional de Química Analítica. João Pessoa, Brasil. 7 al 11 de Octubre de 2007.

M. Grünhut, L.F. Almeida, M.E. Centurión, W.D. Fragoso, B.S. Fernández Band, M.C.U. de Araújo.