

1. Introducción

1.1. ESPECTROSCOPIA EN EL INFRARROJO PRÓXIMO

1.1.1. Introducción

La región infrarroja del espectro está comprendida entre las longitudes de onda de 700 a 10^6 nm. Tanto por razones instrumentales como por las características de la interacción de la radiación con la materia, se divide en tres zonas (tabla 1.1): infrarrojo próximo (NIR, *Near Infrared*), infrarrojo medio (MIR, *Middle Infrared*) e infrarrojo lejano (FIR, *Far Infrared*).

Tabla 1.1. División de la región infrarroja del espectro¹.

Region	Longitud de onda (nm)	Origen de la absorción
NIR	700-2500	Sobretonos y bandas de combinación de vibraciones moleculares fundamentales
MIR	2500-50000	Vibraciones moleculares fundamentales
FIR	50000- 10^6	Rotaciones moleculares

La región NIR fue la primera zona del espectro de absorción no visible que se descubrió², pero el desarrollo y aplicación de métodos espectroscópicos en esta región para la resolución de problemas analíticos ha sido lento.

Las primeras aplicaciones analíticas se desarrollaron durante la década de los 50, como consecuencia de la aparición de los primeros espectrofotómetros comerciales equipados con detectores fotoeléctricos. En 1954 Wilbur Kaye presentó su trabajo en el que se registraban espectros de diferentes líquidos orgánicos en la región comprendida entre 700 y 3500 nm, asignando las diferentes bandas a los diferentes grupos funcionales de la molécula. En este mismo trabajo se muestran posibles aplicaciones analíticas de la técnica: determinación de agua y alcoholes y análisis de aminas e hidrocarburos. En 1960 Goddu revisó sus aplicaciones al análisis cuantitativo de grupos funcionales orgánicos⁴. Según el autor, el número de trabajos en los que se utilizaba la técnica NIR como técnica de análisis era de unos 40.

El primer impulso importante fue en la década de los 60, cuando Karl Norris, líder de un grupo de investigación de la USDA (*United States Department of Agriculture*), empezó a experimentar sus posibilidades en el estudio de matrices complejas de origen natural^{5,6}. Sus trabajos estaban orientados al campo del análisis agroalimentario e hizo que a partir de ese momento, el interés por la espectroscopia NIR creciera notablemente.

Hasta finales de los años 70 los instrumentos comerciales fueron principalmente instrumentos de filtros diseñados para aplicaciones específicas. Es a partir de este momento cuando se empiezan a desarrollar nuevos equipos con diseños mejorados y mayores prestaciones. Así, se construyen los primeros espectrofotómetros que permiten registrar espectros de forma rápida y altamente reproducible. El desarrollo que experimentó la informática también ayudó a la expansión de la técnica. Se puso al alcance del usuario una capacidad de cálculo inexistente hasta el momento, haciendo que a partir de entonces se pudieran utilizar algoritmos relativamente complejos para superar uno de los principales inconvenientes de la técnica: la no especificidad de las bandas de absorción.

Gracias a todos estos avances tecnológicos, el número de aplicaciones NIR en los diferentes campos ha crecido enormemente en los últimos años, tal y como se muestra en el artículo de McClure de 1994⁷. Actualmente se pueden encontrar aplicaciones de la técnica en el análisis de alimentos¹, de productos farmacéuticos⁸, de fibras textiles⁹⁻¹¹, de polímeros¹² o de derivados del petróleo¹³⁻¹⁵, entre otras.

El gran interés que ha despertado la espectroscopia NIR en el sector industrial puede considerarse consecuencia directa de dos de las ventajas que ofrece como herramienta analítica para el control de calidad. Por un lado, la baja absorción molar de las bandas de absorción permite trabajar en modo reflectancia con la consiguiente ventaja de poder registrar el espectro de muestras sólidas sin necesidad de realizar tratamiento alguno de la misma, aumentando así el número y frecuencia de los análisis. Por otro, la doble dependencia de la señal con la naturaleza química y física de la muestra permite tanto su identificación como la determinación de parámetros químicos y físicos de la misma.

1.1.2. Origen de la absorción en el infrarrojo próximo

Para que una molécula absorba radiación electromagnética tienen que darse dos condiciones. Por un lado, la radiación debe tener la energía precisa para satisfacer los

requerimientos energéticos del material. Por otro, debe producirse un acoplamiento entre la radiación y la materia. La radiación en el infrarrojo tiene la energía necesaria para provocar transiciones vibracionales en las moléculas, y la primera condición para la absorción se satisface si una determinada frecuencia de radiación infrarroja corresponde exactamente a una frecuencia fundamental de vibración de una determinada molécula. Para satisfacer la segunda condición de la absorción la molécula debe experimentar un cambio en el momento dipolar cuando tiene lugar la vibración fundamental.

Para una molécula diatómica la frecuencia de vibración puede conocerse, aproximadamente, suponiendo el modelo del oscilador armónico, en el que un átomo se desplaza de su posición de equilibrio con una fuerza proporcional al desplazamiento (ley de Hooke). En este caso, la función de energía potencial sería una parábola, centrada en la distancia de equilibrio, con los niveles de energía vibracional igualmente espaciados y sólo estarían permitidas transiciones entre niveles adyacentes. A causa del espaciado regular entre niveles, la regla de selección implicaría un espectro de una única frecuencia.

En la práctica, cuando dos átomos se aproximan, la repulsión coulombica entre los dos núcleos provoca un incremento más rápido de la energía potencial del que predice la aproximación armónica y cuando la distancia interatómica se aproxima a la distancia en la que tiene lugar la disociación, el nivel de energía potencial se estabiliza. Así podemos decir que las moléculas reales se acercan más al comportamiento de un *oscilador anarmónico* (figura 1.1). Las moléculas tienen un comportamiento armónico sólo cuando la energía potencial es baja, es decir, entorno a la posición de equilibrio.

Para obtener una buena concordancia entre la teoría y la experiencia se añaden términos de corrección a la aproximación armónica que se denominan *correcciones de anarmonicidad*^{1,16}. Una consecuencia que se deduce del modelo del oscilador no armónico es que no sólo es posible observar la banda fundamental ($\Delta i = \pm 1$) sino que también pueden ser observadas bandas correspondientes a transiciones $\Delta i = \pm 2, \pm 3, \dots$, las cuales se denominan *sobretonos* y corresponden a parte de las bandas observadas en el NIR. Otra consecuencia de la anarmonicidad es que los niveles energéticos no están igualmente espaciados, es decir, a niveles de energía más altos el incremento de energía entre niveles consecutivos es menor, por lo que los sobretonos aparecen a frecuencias ligeramente menores que las correspondientes a múltiplos de las frecuencias fundamentales. Además, las transiciones en las que el número cuántico vibracional (Δi) es superior a 1 son mucho menos probables, y, por tanto, la intensidad de las bandas será mucho menor.

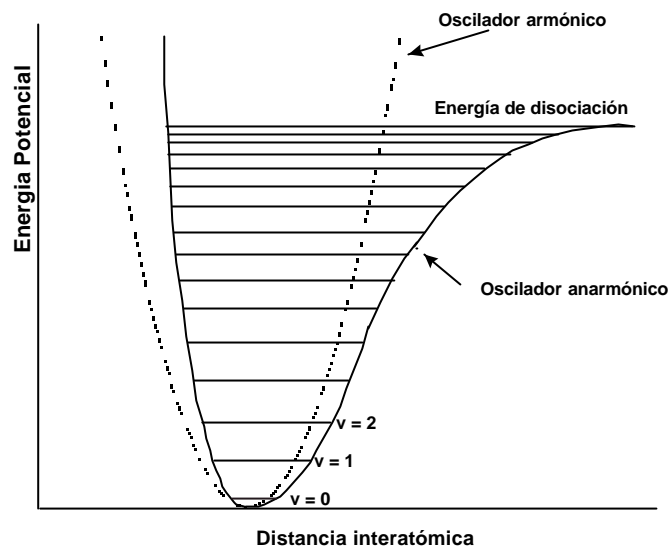


Figura 1.1. Diferencia entre la curva de energía potencial de un oscilador armónico y un oscilador anarmónico.

Aparte de los sobretonos, en la región NIR también aparecen las denominadas *bandas de combinación*, las cuales son debidas al cambio simultáneo en la energía de dos o más modos vibracionales y que se observan en las frecuencias dadas por $\tilde{\nu} = n_1 \tilde{\nu}_1 + n_2 \tilde{\nu}_2 + \dots$, donde n_i son números enteros y $\tilde{\nu}_i$ son las frecuencias de las transiciones que contribuyen a la banda de combinación. Valores positivos de n_i corresponden a suma de tonos que originan bandas a altas frecuencias denominadas *tonos de combinación*. Valores negativos de n_i corresponden a diferencia de tonos que originan bandas llamadas *tonos de sustracción*. Estos últimos son posibles, pero raramente se observan en el espectro NIR.

La información contenida en un espectro NIR es un reflejo de la contenida en un espectro de IR medio, pero las bandas de absorción en NIR normalmente están muy solapadas y son de baja intensidad, menor cuanto mayor es el orden del sobretono. La intensidad de las bandas de combinación y los sobretonos dependen del grado de anarmonicidad del enlace. El hidrógeno, al ser el más ligero de los átomos, vibra con una mayor amplitud en la vibración *stretching*, por lo que ese movimiento se desvía más

apreciamente del modelo del oscilador armónico. Como consecuencia, casi todas las bandas de absorción observadas en el NIR provienen de sobretonos de las vibraciones *stretching* de grupos AH_x o bandas de combinación de estos grupos. En la figura 1.2 se representan las regiones del infrarrojo cercano donde absorben los diferentes enlaces, indicando si la banda de absorción corresponde al primer, segundo o tercer sobretono, o a combinaciones de frecuencias de vibración de diferentes enlaces.

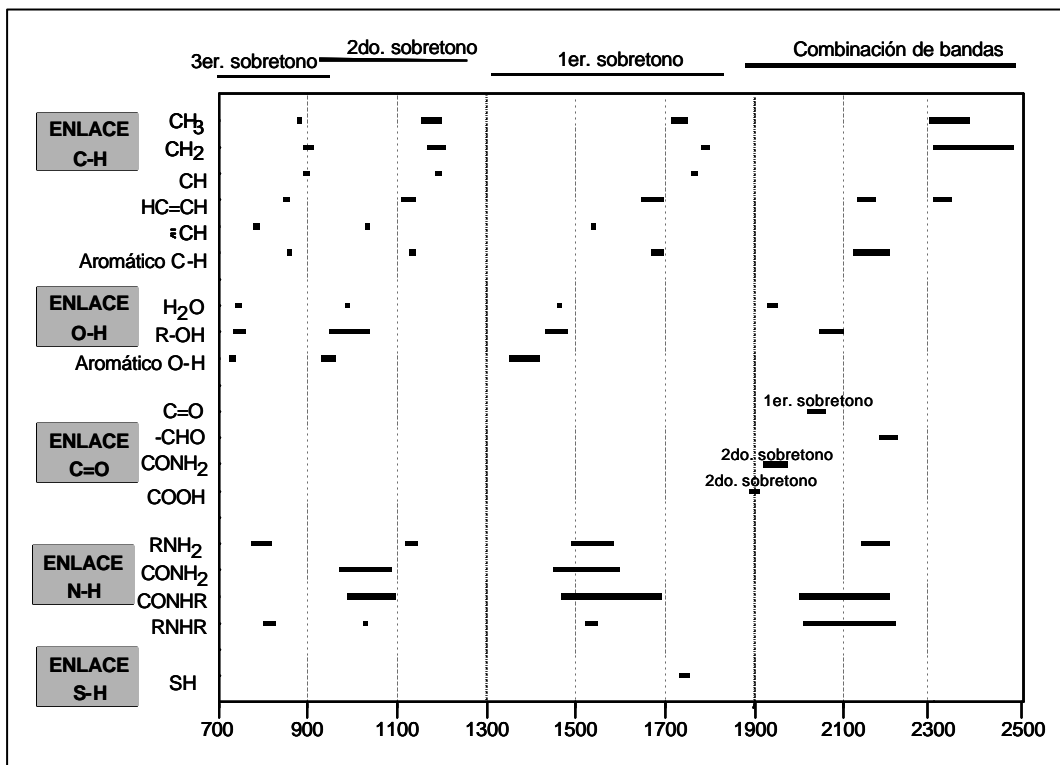


Figura 1.2. Tabla de asignación de bandas en la región NIR.

1.1.3. Modos de registro en NIR

En el intervalo espectral del infrarrojo próximo se realizan medidas de reflectancia, transmitancia o transflectancia. La diferencia básica entre los tres tipos de medidas es la posición de la muestra en el instrumento, como se muestra en la figura 1.3.

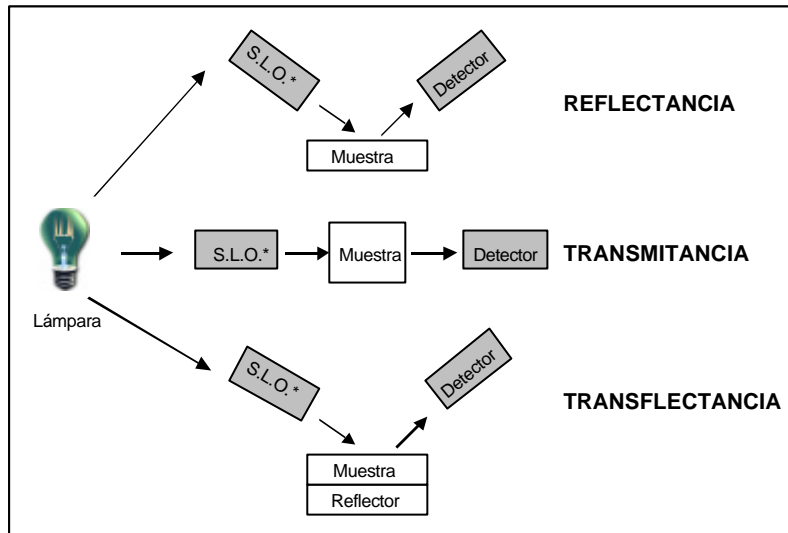


Figura 1.3. Diseños instrumentales en espectroscopia NIR.

S.L.O.*: Selección de longitudes de onda

En todos los casos, la señal analítica que se obtiene en espectroscopia NIR es una función compleja, que habitualmente se expresa como absorbancia aparente ($a = \log(1/R)$) o unidades de Kubelka-Munk cuando las medidas se realizan en modo reflectancia, o como absorbancia ($A = \log(1/T)$) cuando las medidas se realizan por transmisión.

1.1.3.1. Medidas por reflectancia difusa

La espectroscopia de reflectancia estudia la radiación reflejada por la muestra, la cual puede ser especular o difusa.

-La reflectancia especular viene descrita por las leyes de Fresnel y predomina cuando el material sobre el que se produce la reflexión tiene valores altos de los coeficientes de absorción para la longitud de onda incidente; cuando la penetración

de la radiación es muy pequeña en comparación con la longitud de onda y cuando las dimensiones de la superficie reflectante son mucho mayores que la longitud de onda.

-La reflectancia difusa tiene lugar en todas las direcciones de la superficie como consecuencia de los procesos de absorción y dispersión (figura 1.4), y predomina cuando los materiales de la superficie reflectante son débilmente absorbentes a la longitud de onda incidente y cuando la penetración de la radiación es grande en relación a la longitud de onda.

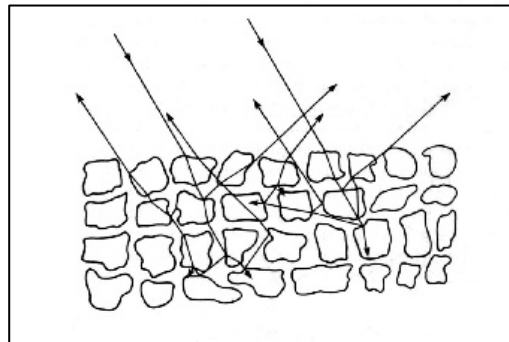


Figura 1.4. Reflectancia difusa.

Las medidas de reflectancia, en condiciones normales, contienen las dos componentes de la reflexión. La componente especular contiene muy escasa información sobre la composición, por lo que su contribución a las medidas se minimiza con la posición del detector respecto a la muestra, mientras que la componente difusa es la que aporta información útil acerca de la muestra, por lo que es la base de las medidas que se realizan con esta técnica. La reflectancia difusa se explica por la teoría de Kubelka-Munk¹⁷. Esta teoría asume que la radiación que incide en un medio dispersante sufre simultáneamente un proceso de absorción y dispersión, de forma que la radiación reflejada puede describirse en función de las constantes de absorción k y de dispersión s . En el caso de muestras opacas y de espesor infinito, la función Kubelka-Munk se describe mediante:

$$f(R_{\infty}) = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2R_{\infty}} = \frac{k}{s} \quad (1.1)$$

donde R es la reflectancia absoluta de la muestra, que es la fracción de radiación incidente que es reflejada.

En análisis cuantitativo la ecuación 1.1 puede escribirse en función de la concentración del analito absorbente (c) como:

$$f(R_{\infty}) = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2R_{\infty}} = \frac{k}{s} = \frac{ac}{s} \quad (1.2)$$

siendo a la absortividad molar

En la práctica, en vez de usar la reflectancia absoluta R se utiliza la reflectancia relativa R que es la relación entre las intensidades de luz reflejadas por la muestra y por un estándar. El estándar es un material estable, con una elevada y relativamente constante reflectancia absoluta en el NIR, tal como el teflón, sulfato de bario, óxido de magnesio o placas cerámicas de alúmina de alta pureza.

Rescribiendo la ecuación de K-M en términos de reflectancia relativa se obtiene:

$$f(R) = \frac{(1 - R)^2}{2R} = \frac{ac}{s} \quad (1.3)$$

Así, para aquellas muestras que siguen esta relación, un gráfico de $f(R)$ en función de la concentración es una línea recta con una pendiente de a/s . Sin embargo, si la matriz presenta absorción o si el analito tiene bandas de absorción intensas, la reflectancia difusa de las muestras no cumple la ecuación de K-M y el gráfico de $f(R)$ frente a la concentración no es lineal.

Se acepta que la ecuación de K-M, como la ley de Beer, es una ecuación límite que sólo puede aplicarse a bandas absorbentes de baja intensidad; o sea, cuando el producto de la absortividad por la concentración es bajo. Este supuesto se cumple en NIR pero como no puede aislarse la absorción del analito de la absorción de la matriz (que frecuentemente absorbe fuertemente a la misma longitud de onda que el analito), se producen desviaciones de la ecuación.

Desde un punto de vista práctico, una alternativa muy utilizada es la aplicación de una relación entre la concentración y la reflectancia relativa análoga a la ley de Beer:

$$\log \frac{R_{estándar}}{R_{muestra}} = \log \frac{1}{R_{muestra}} + \log R_{estándar} \approx \frac{ac}{s} \quad (1.4)$$

Para radiación monocromática el $\log R_{estándar}$ es constante y la ecuación puede escribirse como:

$$A = \log \frac{1}{R} = a'c \quad (1.5)$$

donde A es la absorbancia aparente, R la reflectancia relativa, c la concentración y a' una constante de proporcionalidad. Aunque esta expresión no tiene las bases teóricas de la ecuación de K-M, proporciona resultados muy satisfactorios en las condiciones usadas en muchas aplicaciones de la espectrofotometría por reflectancia difusa.

1.1.3.2. Medidas por transmisión

La absorción de la radiación NIR sigue la ley de Beer y, por tanto, las medidas de transmisión pueden utilizarse con fines cuantitativos. Así pues, se puede definir la absorbancia como:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = -\log T \quad (1.6)$$

donde I_0 es la intensidad de energía incidente e I la intensidad de la radiación detectada después de pasar a través de la muestra.

Sin embargo, de manera análoga a lo que sucede en las regiones del visible y del MIR, se pueden producir desviaciones del cumplimiento de la ley por causas tales como cambios en los enlaces por puente de hidrógeno, complejación o procesos químicos.

Cuando se analizan muestras sólidas por transmisión, no puede asumirse directamente que cualquier sistema siga la ley de Beer, ya que por efecto de la dispersión parte de la radiación puede sufrir reflectancia difusa y en este caso $\log 1/T$ no representa la atenuación de la radiación por absorción. Desde un punto de vista práctico, para realizar

análisis mediante medidas de transmisión se procede del mismo modo que en reflectancia, es decir, utilizando una A aparente. De todos modos, la instrumentación utilizada en este tipo de medidas está diseñada para minimizar los efectos de la dispersión de radiación y, por tanto, la señal analítica depende fundamentalmente de la absorbancia de la muestra.

La medida de sólidos por transmisión presenta como principales ventajas respecto a medidas por reflectancia que tiene mayor sensibilidad y homogeneidad espectral, debido a que, para registrar el espectro, se utiliza una porción mayor de muestra, pero tiene como principal inconveniente que componentes muy sensibles a la radiación (termosensibles) pueden ser afectados por la gran cantidad de energía que atraviesa la muestra.

Una variación de esta metodología son las medidas por transreflectancia (figura 1.3). En este caso se mide la transmitancia después que la radiación haya atravesado dos veces la muestra, la segunda después que un reflector colocado al lado de la muestra provoque que el haz de luz pase una segunda vez por la misma antes de llegar al detector.

1.1.4. Instrumentación

Los primeros espectrofotómetros comerciales NIR aparecieron en la década de los 50. El esquema básico de estos instrumentos era el mismo que el utilizado en los espectrofotómetros UV-Visible o infrarrojo medio (fuente de radiación, sistema de selección de longitudes de onda, compartimento para la muestra y detector) pero modificando solamente los materiales de ciertos componentes para optimizar la respuesta del instrumento.

El primer espectrofotómetro comercial capaz de registrar en la zona NIR fue el Cary Model 14 (fabricado por Applied Physics Corporation, Monrovia, California), aparecido en 1954. El sistema de selección de longitudes de onda estaba integrado por un doble monocromador formado por un prisma de sílice fundida y una red con 600 líneas/mm, siendo el detector de PbS. Este instrumento era capaz de registrar hasta 2650nm.

Después de esta etapa inicial, se desarrollaron espectrofotómetros basados en diversas técnicas ópticas, introduciendo nuevos sistemas de selección de longitudes de onda y detección, consiguiendo registrar espectros de forma más rápida y fiable.

1.1.4.1. Fuente de radiación

Actualmente las fuentes de radiación utilizadas en espectroscopia NIR se pueden clasificar en dos tipos: las de espectro completo y las de intervalo reducido.

En el primer caso, la fuente más usada sigue siendo la lámpara halógena de filamento de tungsteno con ventana de cuarzo. Se trata de una fuente de elevada intensidad de emisión y que cubre ampliamente la zona NIR del espectro electromagnético, proporcionando una radiación continua en el intervalo 320-2500nm.

En el segundo grupo se encuentran los diodos de luz emisora o LEDs (*Light Emission Diodes*)¹⁸⁻²⁰. Se trata de dispositivos semiconductores que emiten radiación NIR en un intervalo estrecho de longitudes de onda. Entre los semiconductores más utilizados se encuentran los de GaAs, que emiten en la región entre 900 y 970nm y los de InGaAs que permiten llegar a longitudes de onda más largas (1600nm).

1.1.4.2. Sistema de selección de longitudes de onda

A excepción de los instrumentos basados en dispositivos LEDs como fuente emisora, el resto necesitan sistemas que permitan la selección de una banda estrecha de longitudes de onda del espectro que proporciona la lámpara. Estos sistemas se pueden clasificar básicamente en dos tipos: dispersivos y no dispersivos.

Dentro de los sistemas dispersivos se encuentran los monocromadores. En general, éstos están formados por una rendija de entrada, que proporciona un haz estrecho de luz, un colimador, que hace paralela la radiación, el elemento dispersante de la radiación y un segundo colimador para enfocar la radiación sobre la rendija de salida. Lo que caracteriza a cada monocromador es el elemento dispersante. El más utilizado actualmente en espectroscopia NIR es la red de difracción²¹. Este dispositivo provoca que cada longitud de onda de la radiación policromática incidente se difracte en diferentes ángulos en cada una de las estrías marcada en la superficie de la red, provocando interferencias constructivas y destructivas. El barrido de longitudes de onda discretas sobre la muestra se realiza moviendo la red mediante un motor de manera que en cada momento una longitud de onda discreta sea enfocada sobre la rendija de salida del monocromador.

El conjunto de los sistemas no dispersivos es más amplio. Se dispone de instrumentos con filtros convencionales, filtros optoacústicos (AOTF, *Acusto-Optic Tunable Filters*) e

instrumentos de transformada de Fourier (FT), con características bastante diferentes entre sí.

En los sistemas de filtros convencionales la selección de longitudes de onda se realiza interponiendo un elemento semitransparente entre la fuente de radiación policromática y la muestra que permita el paso de determinadas longitudes de onda. Los filtros más sencillos son los de absorción^{22,23}, en los cuales las longitudes de onda transmitidas dependen del material con el que estén hechos. Otro tipo de filtros utilizados en espectroscopia NIR son los filtros de interferencia, llamados también filtros de Fabry-Perot, que se basan en el fenómeno de la interferencia óptica²⁴⁻²⁶. Las longitudes de onda transmitidas dependen del índice de refracción del material y del grosor del filtro. Los filtros de interferencia transmiten mayor cantidad de radiación que los filtros de absorción, con anchos de banda más estrechos.

Los filtros optoacústicos^{27,28} están basados en la interacción de la luz con las ondas sonoras. Para preparar un filtro de este tipo se acoplan dos transductores piezoeléctricos a las caras de un cristal birrefringente (normalmente TeO₂). Los transductores son los responsables de transformar la señal de radiofrecuencia en una señal acústica. Cuando un haz de luz policromática incide en el cristal, al aplicar una señal acústica, además del haz original, se generan dos haces adicionales de luz monocromática polarizada, de los cuales sólo se utiliza uno con finalidades analíticas. Los dos haces de luz monocromática tienen la misma longitud de onda, la cual depende de la velocidad y de la frecuencia de la onda sonora, de la birrefringencia y de las medidas físicas del cristal. Para generar radiaciones monocromáticas de diferente longitud de onda se cambia el valor de la radiofrecuencia inicial (diferentes señales de radiofrecuencia provocan diferentes cambios en el índice de refracción del material).

Estos sistemas son rápidos, con una alta reproducibilidad de la longitud de onda y robustos, lo que los hace especialmente útiles en el desarrollo de instrumentación de planta industrial. A pesar de ello, su utilización no se ha extendido, debido principalmente al coste económico.

Los instrumentos NIR de transformada de Fourier (FT-NIR) se basan en la utilización de interferómetros como sistema de selección de longitudes de onda. El interferómetro más conocido es el de Michelson²¹, si bien es poco empleado en este tipo de instrumentos debido a su poca robustez.

Otro tipo de instrumentos de FT-NIR utilizan el interferómetro de prismas, donde dos prismas de cuarzo de diferentes tamaño están confrontados. Se trata de un sistema óptico donde uno de los dos prismas es fijo y el otro móvil. La radiación es polarizada 45° antes de pasar por los prismas. Al atravesarlos, el haz se polariza 90° , con diferentes velocidades de propagación. Como los prismas se encuentran en movimiento, el recorrido del haz de radiación es ligeramente diferente y se produce un desfase entre las dos componentes de polarización. La posterior recombinación de estos haces genera el interferograma, el cual muestra la relación entre la distancia recorrida por el prisma móvil y la intensidad de luz generada por la interferencia.

1.1.4.3. Compartimento para la muestra

Para registrar el espectro de una muestra, ésta se coloca entre el sistema de selección de longitud de onda y el detector.

Una de las principales ventajas que presenta la espectroscopia NIR es que el tratamiento de las muestras a analizar es prácticamente nulo. Dada la variedad de estados en que se pueden presentar las muestras, ya sean líquidos de diferentes viscosidades o sólidos con distintos tamaños y formas, ha sido necesario diseñar accesorios que puedan ser acoplados a los espectrofotómetros, de modo que, con la mínima manipulación de la muestra, el registro de los espectros sea satisfactorio. Así pues, para el análisis de sólidos por reflectancia, se han desarrollado sondas de fibra óptica, dispositivos de cubeta, dispositivos para el análisis directo de comprimidos y cápsulas, etc.

Para el análisis de líquidos, además de los diseños tradicionales para llevar a cabo las medidas de transmitancia, se han desarrollado sistemas de medida de transflectancia. Estos diseños sitúan la muestra en una cubeta de cuarzo y depositan una superficie reflectante en una de las caras. El haz incidente entra por la cara transparente de la cubeta, atraviesa la muestra y se refleja en la otra cara de la cubeta, volviendo a atravesar de nuevo la muestra y siendo recogida por el detector. Otros diseños utilizan la sonda de fibra óptica como elemento transmisor del haz incidente y reflejado. La reflexión se produce por una placa reflectante situada a cierta distancia de la salida de la sonda. Ésta se sitúa de forma reproducible mediante un cabezal especial. Esta configuración permite realizar medidas de líquidos de forma rápida y directa.

1.1.4.4. Detectores

Los detectores utilizados en espectroscopia NIR son fotoeléctricos. En ellos, los fotones incidentes afectan directamente al estado electrónico del material fotosensible del detector, produciendo una señal eléctrica que constituye la respuesta del detector. El más utilizado es el de sulfuro de plomo, dispositivo semiconductor que presenta una sensibilidad adecuada en la región 1100-2500nm a temperatura ambiente. Para realizar medidas por debajo de 1100nm se usa el detector de silicio.

Otro tipo de detectores más modernos son los FPA (*Focal Point Array*) que son los equivalentes en el infrarrojo cercano de los CCD (*Charged-Coupled Devices*)^{29,30}, utilizados en la región UV-Vis. Son detectores multicanal que permiten mayor rapidez en el registro y mejor relación señal/ruido cuando se comparan con los detectores monocanales tradicionales. Sin embargo, el principal problema para su uso es el coste de adquisición, dado que pueden llegar a ser tan caros como el espectrofotómetro.

Un aspecto especialmente importante es la disposición de los sistemas detectores. Para medidas de transmitancia, es suficiente con situar el detector en línea con la muestra y el haz incidente. No obstante, para medidas de reflectancia, especialmente en sólidos, lo que se quiere es captar la radiación reflejada por la muestra. En estos casos, se acostumbra a trabajar con más de un detector, los cuales se sitúan en posiciones determinadas, no alineadas con el haz incidente.

1.1.5. Ventajas e inconvenientes de la espectroscopia NIR

Las principales ventajas de la espectroscopia NIR como herramienta de análisis cualitativo y cuantitativo son:

- La técnica no es destructiva ni invasiva.
- La preparación de la muestra es sencilla y la medida se realiza con rapidez. La posibilidad de realizar medidas tanto en estado sólido como líquido ha permitido minimizar la manipulación previa de la muestra por parte del analista y realizar un número elevado de análisis, aspecto muy importante en el análisis de control de calidad.
- El análisis presenta un bajo coste. La ausencia de reactivos y otro tipo de materiales para la preparación de muestras hace que los costes de aplicación de la técnica sean

mínimos. Por otro lado, al ser un análisis automático y de gran rapidez produce un aumento de la capacidad analítica del laboratorio. Estas razones hacen que la inversión inicial sea rápidamente amortizada.

-La técnica permite la determinación de varios analitos de la muestra sin tener que seguir un procedimiento analítico diferente para cada uno de ellos. Esta posibilidad implica invertir mucho tiempo cuando se ponen a punto las calibraciones, pero permite la posterior automatización del análisis.

-Es posible determinar parámetros no químicos de una muestra, puesto que con frecuencia los espectros NIR están afectados por parámetros físicos.

-La resistencia de los materiales utilizados y la ausencia de partes móviles en el sistema de detección hacen que sea una técnica idónea para procesos de control en planta. Esta aplicación se ve favorecida por la gran tendencia a la miniaturización y compactación que está sufriendo esta instrumentación.

-En muchos campos de aplicación, la exactitud de la técnica NIR es comparable a otras técnicas analíticas y, generalmente, su precisión es mayor debido a la falta de tratamiento de la muestra.

Pero como toda técnica también tiene sus inconvenientes:

-La adquisición del espectrofotómetro NIR es comparativamente cara.

-La complejidad de la señal NIR obliga a aplicar técnicas quimiométricas que permitan modelar los datos para identificar y cuantificar muestras problema.

-La preparación del calibrado es dificultosa, ya que es necesario disponer de muestras para ampliar el intervalo de concentración de las muestras problema (habitualmente representan un intervalo de concentración demasiado estrecho). Además, éstas deben presentar características físicas y químicas similares a las reales.

-No es posible analizar muestras problema que presenten una variabilidad (física o química) no contemplada en la calibración.

-La técnica es poco sensible, especialmente en medidas de reflectancia difusa, imposibilitando, en general, el análisis de componentes minoritarios.

-Presenta dificultades en la transferencia de calibraciones entre diferentes instrumentos, ya que pequeñas diferencias entre ellos pueden dar lugar a errores importantes en los resultados, lo que puede obligar a que, para analizar una misma muestra problema, sea necesario preparar un calibrado en cada instrumento.

1.1.6. Espectroscopia NIR en el control de procesos

Según Callis y colaboradores³¹ el *objetivo de la química analítica de procesos es proporcionar información cualitativa y cuantitativa del proceso químico. Esta información puede ser utilizada no sólo para monitorizar y controlar el proceso, sino también para optimizar el eficiente uso de energía, tiempo y materias primas.* En este mismo trabajo se describen las diferentes eras de la química analítica de procesos, desde que la muestra era tomada en la línea de producción y llevada al laboratorio para su posterior análisis (*off-line*), hasta que la medida analítica es hecha en la misma línea de producción sin necesidad de haber contacto físico con la muestra (*non-invasive*).

La evolución de los métodos espectrofotométricos desde la era *off-line* a la era *non-invasive* se ha llevado a cabo al cambiar el concepto de *llevar la muestra a la luz* por el de *llevar la luz a la muestra*. En los métodos espectrofotométricos implantados en control de procesos, la radiación se conduce a la muestra mediante sondas de fibra óptica, las cuales tendrán diferentes diseños según su función. Éstas pueden ser insertadas directamente en la línea de proceso o pueden llegar a una celda de flujo por la que se hace pasar parte de la muestra desviada de la línea de producción^{32,33}. Las medidas de reflectancia se pueden realizar a través de una ventana en la línea de procesos, mientras que las medidas de transmitancia pueden ser realizadas insertando dos sondas de fibra óptica, una enfrente de la otra, de manera que por una sonda llegue la luz y la otra recoja la radiación que no ha absorbido la muestra. Existe otro tipo de sondas con las que se realizan medidas de transreflectancia, en las que la radiación llega a través de la sonda de fibra óptica, atraviesa la muestra y después de reflejarse la radiación va al detector a través de la misma sonda³⁴. Con el uso de multiplexores se pueden dirigir diferentes sondas a distintos puntos de la producción³⁵. Además, la utilización de las fibras ópticas permite que tanto el instrumento como el operador puedan estar lejos del ambiente agresivo de la planta de producción³⁶.

Durante los últimos años, la espectroscopia NIR asociada con el análisis multivariable³⁷ ha ido ganando aceptación en el mundo industrial como técnica de control

rutinario en la misma línea de producción³⁸, ya que una vez establecida la calibración, el análisis es rápido. El hecho de poder realizar los análisis in-situ mediante espectroscopia NIR proporciona una serie de ventajas que mejoran la producción³⁹. Entre estas ventajas se encuentran el bajo mantenimiento del equipo, la no utilización de reactivos, la rapidez de los análisis, etc.

Hoy en día, tanto la espectroscopia NIR como la calibración multivariable aparecen como herramientas destacadas en el control de procesos y sus aplicaciones abarcan campos tan diferenciados como la biotecnología, las ciencias de la tierra, atmosférica y la mineralogía, la monitorización ambiental, la industria química, la industria agroalimentaria, la química clínica y médica, la industria petroquímica (petróleo, gas natural y combustibles), la producción farmacéutica, la industria de polímeros y el análisis de superficies.

1.2. QUIMIOMETRIA

1.2.1. Introducción

La señal analítica producida por un instrumento de medida puede considerarse una señal “en bruto” que difícilmente podrá utilizarse de forma directa. En la mayor parte de los casos se trata de una magnitud física que resulta necesario correlacionar con la magnitud química de interés. La necesidad de tratar adecuadamente la información adquirida para extraer de ella la más importante, ha llevado al desarrollo de nuevos procedimientos de una rama de la química analítica denominada Quimiometría. Ésta se podría definir como la parte de la química que, usando métodos matemáticos, estadísticos y de lógica formal, diseña o selecciona procedimientos de medida óptimos y proporciona la máxima información relevante de los datos analíticos⁴⁰. La Quimiometría abarca un gran número de temas entre los que puede incluirse el tratamiento de señales, el diseño de experimentos, la optimización de los procesos de análisis y síntesis, el reconocimiento de pautas, la calibración, etc.

La utilización de los métodos quimiométricos permite, entre otras cosas, la identificación de muestras, el análisis de mezclas complejas sin necesidad de separaciones previas, la posibilidad de determinar simultáneamente varios analitos, aumentar la sensibilidad respecto a los métodos convencionales, etc. Las principales ventajas que se derivan son un conocimiento más amplio del problema y la posibilidad de una alta velocidad de análisis, lo que permite reducir costes y tiempo de análisis.

1.2.2. Etapas del proceso de calibración

Para llevar a cabo un análisis, ya sea cualitativo o cuantitativo, es necesario establecer, previamente, modelos capaces de predecir propiedades desconocidas de nuevas muestras, de las cuales se ha determinado previamente la magnitud de la señal analítica.

El modelado de los datos puede definirse como un proceso formado por las etapas que se describen a continuación:

-Preparación del conjunto de entrenamiento. Obtención de un conjunto limitado de muestras de las que se conozca la propiedad a determinar y que sea representativo de las muestras para las que se quiere realizar predicciones futuras. En el caso de la

espectroscopia NIR, el conjunto debe ser representativo tanto de las fuentes de variación químicas, como de las físicas consecuencia del proceso de fabricación y que afectan al espectro (tamaño de partícula, granulometría, cristalización, etc.).

-*Registro de las señales analíticas.* La información puede provenir de fuentes muy diversas, que en nuestro caso son los espectros (UV-Vis y NIR) de las muestras. A partir de estas señales instrumentales se obtendrá la información química deseada.

-*Pretratamiento de los datos.* En esta etapa se minimizan posibles contribuciones no deseadas presentes en las señales, que disminuyen la reproducibilidad y pueden provocar que el sistema presente ciertas características de no-linealidad que darían lugar a estimaciones menos sólidas.

-*Construcción del modelo.* Selección del modelo que establece la relación entre la señal analítica y la variable respuesta deseada. El modelo puede tener una base totalmente empírica o bien estar soportada por una base teórica que explica el fenómeno físico o químico responsable de la señal analítica. La optimización del modelo se realiza ensayando distintos algoritmos, tratamientos matemáticos, intervalos de longitud de onda, etc.

-*Validación del modelo.* Aplicación del modelo establecido a un número de muestras de las que se conoce la propiedad a determinar, que no hayan sido utilizadas en la etapa de construcción del modelo. De esta manera se verifica que el modelo construido constituye una correcta descripción del conjunto de datos experimentales.

- *Predicción de nuevas muestras.* Utilización del modelo construido y validado para predecir la propiedad en muestras nuevas de las que se ha determinado previamente la magnitud de la señal analítica.

1.2.3. Pretratamientos espectrales

Las medidas de reflectancia contienen las dos componentes de la reflexión, la especular y la difusa. La componente difusa, que contiene la información analítica, es consecuencia de procesos de absorción y de dispersión, por lo que la señal analítica que se obtiene depende tanto de las características físicas como químicas de la muestra.

La dispersión depende fundamentalmente del tamaño de partícula, distribución del tamaño de partícula en la muestra, forma de las partículas, tipo de cristalización, etc. y tiene un efecto multiplicativo sobre la absorción de radiación por la muestra que se añade a otros efectos aditivos como desplazamiento de la línea base o absorciones químicas. Puede ser la responsable del mayor porcentaje de variación entre las muestras, lo que puede resultar negativo en el proceso matemático de elaboración del modelo de calibración cuando el objetivo es la determinación cuantitativa de un componente químico. Este problema puede reducirse tratando matemáticamente los espectros antes de establecer el modelo de calibración, evitando así que estos efectos dominen sobre las variaciones de las medidas con la concentración⁴¹.

A continuación se expondrán los tratamientos matemáticos utilizados a lo largo de esta memoria, aunque no hay que olvidar que en espectroscopia NIR se han empleado otros pretratamientos, como la normalización⁴², corrección del efecto multiplicativo de la dispersión⁴³, o ajuste de la línea base⁴⁴, entre otros.

1.2.3.1. Derivación

La derivación de espectros es una de los pretratamientos más utilizados en espectroscopia NIR para minimizar los efectos de la dispersión. Permite resaltar diferencias espectrales, poniendo de manifiesto señales que originalmente aparecían solapadas. La primera derivada permite eliminar los términos constantes a todas las longitudes de onda, es decir, desplazamientos de línea base. La segunda derivada elimina los términos que varían linealmente con la longitud de onda. La mayor limitación que tiene el uso de las derivadas es la disminución de la relación señal/ruido que se produce al aumentar el grado de la derivada, debido a que es un tratamiento altamente sensible a la presencia de ruido en el espectro original.

Uno de los métodos más utilizado para el cálculo de derivadas es el propuesto por Savitzky-Golay⁴⁵.

1.2.3.2. Variable normal estándar

Variable normal estándar o SNV (*Standard Normal Variate*) es un tratamiento propuesto en 1989 por Barnes y colaboradores⁴⁴ para corregir los efectos del tamaño de partícula en espectroscopia NIR.

El SNV se basa en autoescalar cada uno de los espectros. En primer lugar el espectro a corregir (x_j) se centra restando el valor medio de la absorbancia del espectro (\bar{x}_i) a los valores de absorbancia obtenidos en cada longitud de onda j ; posteriormente, se escala el espectro centrado dividiéndolo por la desviación estándar (s_i) hallada al calcular la absorbancia media del espectro

$$x_i^{SNV} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_i}{s_i} \quad (1.7)$$

El conjunto de espectros tratados de esta forma tiene como media el valor cero y una varianza igual a uno. Además, son independientes de la escala original de trabajo, cumpliendo con el objetivo del tratamiento, que es obtener una escala común para todos los espectros y así facilitar la comparación de diferencias espectrales.

1.2.3.3. Corrección ortogonal de la señal

La corrección ortogonal de la señal o OSC (*Orthogonal Signal Correction*) es una técnica de pretratamiento de datos espectroscópicos desarrollada por S. Wold y colaboradores⁴⁶ diseñada para corregir la matriz de datos, eliminando de ésta la parte de información que es ortogonal a la matriz de concentraciones.

El algoritmo utilizado en este tipo de corrección es similar al algoritmo NIPALS (*Nonlinear Iterative Partial Least Squares*), usado comúnmente en análisis por componentes principales y en regresión parcial por mínimos cuadrados, y está descrito con detalle en el trabajo de S. Wold⁴⁶.

Puede conducir a una solución de sobreajuste con mucha facilidad, obteniéndose una calibración muy buena, pero con reducida capacidad predictiva. Los parámetros que permiten controlar este sobreajuste son el número de variables latentes internas y el número de factores OSC. A medida que aumenta el número de variables latentes internas, el

tratamiento OSC elimina cada vez más información no correlacionada con la concentración del analito. El número de factores OSC es el número de tratamientos OSC a que se someten los espectros. Esto significa efectuar un tratamiento OSC y obtener los espectros corregidos para aplicar sobre ellos un nuevo tratamiento OSC, y así sucesivamente. No obstante, un sólo factor suele ser suficiente y una segunda pasada del filtro produce con frecuencia sobreajuste^{46,47}

Este tipo de tratamiento matemático ha sido ya aplicado con éxito al pretratamiento de datos espectroscópicos NIR en transferencia de calibraciones⁴⁷ y para corregir las diferencias espectrales entre diferentes tipos de muestras⁴⁸.

1.2.4. Análisis en componentes principales (PCA)

Muchas de las herramientas quimiométricas, tanto de clasificación de muestras como de métodos de calibración, se basan en un análisis previo en componentes principales (PCA; *Principal Component Analysis*), que pone de manifiesto las relaciones existentes entre las diferentes muestras y reduce la dimensionalidad de los datos experimentales^{49,50}, por lo que va a ser introducido antes de describir las técnicas utilizadas en esta memoria.

1.2.4.1. Tratamiento previo de los datos

Al calcular un PCA (y, en general, cualquier método basado en una reducción de variables), no se suelen utilizar los datos originales, sino que éstos son previamente tratados. Los tratamientos más frecuentes son el centrado y el autoescalado, y sus efectos han sido ampliamente discutidos en la bibliografía^{51,52}. Además, en función de cómo sea la señal obtenida, muchas veces también es necesario aplicar los pretratamientos espectrales descritos en el apartado 1.2.3.

Consideremos una matriz \mathbf{X} de datos donde cada fila es una muestra y cada columna una variable. Si denominamos x_{ik} al elemento de la matriz que está en la fila i y la columna k , se pueden efectuar las siguiente operaciones:

- Centrado por columna: se calcula el valor medio de cada variable (\bar{x}_k) del conjunto de calibración y se resta a cada punto (x_{ik}) de la columna.

$$x_{ik}^{centrado} = x_{ik} - \bar{x}_k \quad (1.8)$$

El valor medio corresponde al centro del modelo, y los valores de todas las variables quedan ahora referidas a este centro, manteniendo las unidades originales.

- Autoescalado: después de centrar cada columna, se divide el resultado por la desviación estándar de la misma, s_k . De esta forma la varianza de cada variable vale la unidad.

$$x_{ik}^{autoescalado} = \frac{x_{ik} - \bar{x}_k}{s_k} \quad (1.9)$$

Geoméricamente es equivalente a cambiar la longitud de los ejes de coordenadas. Este tratamiento debe ser utilizado cuando las variables originales están expresadas en unidades distintas o cuando sus varianzas son muy diferentes, porque en caso contrario, las variables con gran varianza quedarían primadas. De esta forma, todos los ejes tienen la misma longitud y cada variable tiene la misma influencia en el cálculo.

1.2.4.2. Interpretación del PCA

El espectro de una muestra registrado a k longitudes de onda puede describirse matemáticamente como un vector con k coeficientes. Teniendo en cuenta esta premisa, se puede considerar el espectro de cada muestra como un punto en un espacio de k dimensiones. Si representamos los espectros de m muestras en este espacio de k dimensiones, obtendremos una nube de m puntos dispersos, pero si las muestras están relacionadas los m puntos aparecerán agrupados.

El objetivo del PCA es hallar las direcciones en que se ordenan los m puntos con el objetivo de reducir la dimensión inicial del sistema de k a a dimensiones ($a < k$) manteniendo la información relevante del sistema lo más intacta posible. Geométricamente es un cambio de ejes, con lo que representamos los puntos en un nuevo sistema de coordenadas con menos ejes que en el inicial. El método busca las direcciones ortogonales que expliquen la máxima variabilidad de las muestras y las utiliza como nuevos ejes de

coordenadas. Estos nuevos ejes reciben el nombre de **componentes principales** (PCs). El primer componente principal es la dirección que explica la máxima variabilidad. El segundo se escoge de tal forma que sea perpendicular al primero, y que explique la máxima variabilidad una vez eliminada la explicada por el primer componente principal, y así sucesivamente. Para poder definir matemáticamente estos nuevos ejes se utilizan los *loadings* que son los cosenos de los ángulos que forman cada uno de estos nuevos ejes con los antiguos. Las coordenadas de las muestras en estos nuevos ejes son los *scores*. En la figura 1.5 se muestra gráficamente el proceso llevado a cabo por el PCA en un sistema donde $k=3$ y $a=2$.

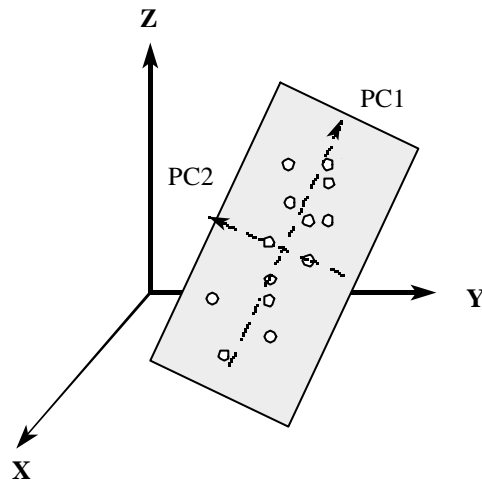


Figura 1.5. Interpretación geométrica de un PCA.

Matemáticamente la matriz de datos \mathbf{X} (datos espectrales) se descompone en el producto de dos matrices, \mathbf{T} (matriz de scores) y \mathbf{P} (matriz de loadings), más una matriz \mathbf{E} de residuales de \mathbf{X} :

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} = \sum_{a=1}^A \mathbf{t}_a \mathbf{p}_a^T + \mathbf{E} \quad (1.10)$$

siendo \mathbf{t}_a y \mathbf{p}_a , respectivamente, el vector de scores y el vector de loadings del componente principal a -ésimo y el superíndice T indica la matriz transpuesta.

Los diferentes componentes principales no contienen la misma información. Los primeros describen la fuente de variación más importante de los datos, que se puede asociar a la información más relevante. En cambio, los últimos describen pequeñas

variaciones entre las muestras que pueden ser debidas al ruido instrumental o errores experimentales y pueden ser descartados, permitiendo así una reducción importante del número de variables.

Resumiendo, se puede decir que el conjunto de datos \mathbf{X} , que estaba descrito por variables correlacionadas, ahora está definido por componentes principales, que son variables no correlacionadas en un nuevo sistema de ejes ortogonales.

Existen diferentes algoritmos de cálculo para obtener la matriz \mathbf{T} y \mathbf{P} . El más conocido es el algoritmo NIPALS⁵³ (*Nonlinear Iterative Partial Least Squares*) que ha sido muy utilizado puesto que permite no tener que calcular todos los componentes principales posibles, sino sólo una pequeña parte. El programa The Unscrambler⁵⁴ utilizado en este trabajo de investigación utiliza este algoritmo para el cálculo del PCA.

Un aspecto fundamental en PCA es la elección del número de componentes principales que contienen la información relevante del sistema de estudio. Se han descrito varios procedimientos para la estimación del número de componentes principales significativos. El más habitual es representar la varianza explicada (o la varianza residual) en función del número de PCs y escoger el número mínimo para el que no se encuentra una mejora significativa. Esta selección puede hacerse por simple observación de la gráfica o aplicando un test F al cociente de varianzas. De cualquier forma, el número de componentes principales escogido debe tener un sentido químico y debe ser coherente con lo que se observa en la gráfica.

1.2.5. Métodos de reconocimiento de pautas

Los métodos de reconocimiento de pautas⁴⁰ pueden ser definidos como un conjunto de técnicas quimiométricas cuyo objetivo es caracterizar la muestra a partir de un adecuado tratamiento estadístico de la información recogida. Gran parte de los métodos de reconocimiento de pautas se dirigen a condensar la información multidimensional obtenida en unas pocas dimensiones y suministrar un criterio estadístico que permita discernir, con un determinado nivel de confianza, si dos objetos son o no son iguales, o si una muestra pertenece o no a una determinada clase.

En función de si se conoce o no previamente la pertenencia de una muestra a una determinada clase, los métodos de reconocimiento de pautas se pueden clasificar de la siguiente manera:

- *Métodos no supervisados*: no se conoce previamente la clase a la que pertenecen las muestras. El objetivo de estas técnicas es el estudiar si en un conjunto grande de muestras existen grupos diferenciados de las mismas, es decir, si algunas muestras son parecidas entre sí y, a la vez, diferentes de las demás.
- *Métodos supervisados*: se conoce previamente las clases presentes en el conjunto de datos. El objetivo es separar estas clases y encontrar procedimientos que permitan establecer a qué clase pertenece una muestra desconocida.

En general, los métodos no supervisados agrupan y los supervisados clasifican. Por tanto, los métodos supervisados son las técnicas de más interés para el químico analítico ya que gran parte del análisis cualitativo podría englobarse dentro de este epígrafe.

Para establecer las fronteras de las clases, la mayoría de estos métodos se basan en la medida de la similitud entre objetos. El objetivo básico en todos los casos es establecer un criterio matemático que permita expresar de forma paramétrica la semejanza o disparidad entre dos objetos o entre un objeto y una clase, de forma que sea posible discriminar a qué clase pertenece una muestra. Fundamentalmente existen dos formas matemáticas de expresar este concepto: medidas de correlación o de distancia.

1.2.5.1. *Identificación y cualificación en espectroscopia NIR*

En espectroscopia NIR la identificación de una sustancia por observación visual de su espectro es difícil, ya que éste está constituido por bandas muy anchas que normalmente están superpuestas. Los primeros estudios de identificación de sustancias descritos en la bibliografía se dirigen a la caracterización de unas pocas estructuras por asignación de bandas³, a semejanza de otros muchos estudios realizados en la región del infrarrojo medio. Sin embargo, para abarcar las problemáticas habituales en análisis cualitativo es necesario acudir a los métodos de reconocimiento de pautas. Éstos permiten la rápida identificación del espectro NIR de una muestra y, opcionalmente, su cualificación. La **identificación** asegura la identidad de una muestra, mientras que la **cualificación** establece si la muestra cumple las especificaciones del producto, es decir, está dentro de la variabilidad aceptada del producto debido a sus características físicas y químicas.

1.2.5.1.1. Estrategia para el análisis cualitativo en espectroscopia NIR

La puesta a punto de técnicas de clasificación sigue el esquema general descrito en el apartado 1.2.2., pero con algunos rasgos diferentes. El procedimiento a seguir para realizar la identificación mediante métodos de clasificación es:

1) Obtener un conjunto de señales analíticas de uno o varios productos, que formaran el conjunto de entrenamiento. La mayoría de métodos de reconocimientos de pautas utilizados en espectroscopia NIR son métodos supervisados (el número de clases está perfectamente definido) y de modelado rígido. Por este motivo, la elección del conjunto de muestras de entrenamiento es el punto más importante puesto que el método de clasificación sólo reconocerá la variabilidad que se ha introducido. La biblioteca debe incluir todas las posibles fuentes de variabilidad espectral, es decir, para cada producto debe disponerse de un conjunto de muestras perfectamente conocidas que recojan la máxima variabilidad conocida y aceptada del producto, así como las posibles fuentes de variabilidad asociadas al registro de espectros (registros realizados en días distintos por varios operadores).

2) Crear lo que se denomina una biblioteca. Dado que en las técnicas de clasificación la selección de la información que se usa es muy importante, el pretratamiento de los espectros o el intervalo de longitudes de onda han de ser correctamente seleccionados. Así, por ejemplo, es habitual que la biblioteca se construya con espectros en 2ª derivada para aumentar la diferenciación entre los espectros de diferentes productos y reducir la variabilidad espectral debida a la dispersión. La presencia de ruido o información no relevante puede ocultar información útil para establecer correctamente las clases del sistema.

Dada la variabilidad posible de datos y/o problemas es difícil el establecimiento de procedimientos generales para seleccionar el método de análisis cualitativo. El analista debe escoger cual de los criterios es el más apropiado. Los tres métodos que se han utilizado en esta memoria para el análisis cualitativo de productos farmacéuticos, que se describirán en los siguientes apartados, son:

- Correlación en el espacio de las longitudes de onda.
- Distancia en el espacio de las longitudes de onda.
- Varianza residual

A partir de la información contenida en la biblioteca, las técnicas de modelado realizan una descripción matemática de cada agrupación, que equivale a construir un entorno alrededor de cada clase⁴⁰. Un objeto se clasifica en función de su posición respecto a las clases definidas, siendo posible que:

- El objeto se sitúe dentro de una clase, por lo que es identificado.
- El objeto no se sitúe en ninguna clase, por lo que no es posible ninguna asignación.
- El objeto se sitúe dentro de los límites de dos o más clases, por lo que se identifica ambiguamente y debe establecerse un criterio de aceptación.

3) Registrar la señal de la muestra y compararla con las de la biblioteca usando criterios matemáticos que permitan expresar de una forma paramétrica la similitud entre los espectros comparados. Si este valor supera un cierto límite, se considera que los espectros son idénticos y, por tanto, se identifica la muestra como el producto incluido en la biblioteca.

4) Validar la biblioteca, interna y externamente, antes de poder ser utilizada en rutina. Debe comprobarse que al final no existen productos ambiguos y que los métodos empleados proporcionan resultados correctos para identificar y/o cualificar.

1.2.5.1.2. Identificación por correlación en el espacio de las longitudes de onda

El coeficiente de correlación (\tilde{r}_{jk}) es una forma muy utilizada en espectroscopia NIR⁵⁵⁻⁵⁷ para expresar la similitud entre un espectro desconocido (k) y el espectro medio de cada producto (j) incluido en la biblioteca. Matemáticamente es el coseno del ángulo entre los vectores del espectro de la muestra y el espectro medio de cada uno de los productos de la biblioteca. Se calcula como:

$$r_{jk} = \frac{\sum_{i=1}^p (x_{ij} - \bar{x}_j) - (x_{ik} - \bar{x}_k)}{\sqrt{\sum_{i=1}^p (x_{ij} - \bar{x}_j)^2} \sqrt{\sum_{i=1}^p (x_{ik} - \bar{x}_k)^2}} \quad (1.11)$$

donde p es el número de longitudes de onda, los subíndices k y j indican, respectivamente, muestra y producto de referencia, x_i es el valor medido a la longitud de onda i , \bar{x}_j es el espectro medio del producto de referencia j y \bar{x}_k es el espectro medio de la muestra.

El coeficiente de correlación puede presentar valores entre -1 y +1, donde +1 indica una perfecta correlación entre la muestra desconocida y el producto de la biblioteca, el valor 0 muestra una falta de correlación lineal entre espectros y -1 indica una correlación opuesta de los espectros. Sin embargo, el ruido aleatorio asociado a las medidas hace que el valor +1 pueda no llegar a alcanzarse y, por tanto, hay que definir un valor umbral de identificación. La identidad de la muestra se establece buscando el espectro medio de la biblioteca que proporciona un coeficiente de correlación más próximo a 1, siempre que supere el umbral establecido. Si el espectro de la muestra problema no supera el umbral de correlación para ninguno de los productos incluidos en la biblioteca, la muestra no puede ser identificada positivamente como ningún producto.

Las ventajas que ofrece este método de identificación son:

- Poca sensibilidad a los cambios de absorbancia, por lo que no le afectan variaciones en la concentración o pequeñas fluctuaciones en la producción.
- Requiere de pocas muestras para la construcción de la biblioteca.
- El algoritmo está implementado en muchos softwares comerciales.

Pero también presenta sus desventajas:

- Falta de especificidad, provocando que en ciertas ocasiones se produzcan ambigüedades.
- Dada la independencia del coeficiente de correlación con la escala, no se puede predecir cómo quedará afectado el coeficiente por variaciones aleatorias entre muestras, lo que provoca que el umbral deba fijarse para cada problema en particular.
- No permite incluir la variabilidad espectral de cada producto (sólo utiliza el espectro medio).

Existen otros algoritmos para llevar a cabo la identificación de productos, aunque éstos requieren más lotes por producto, pero pueden ser útiles para bibliotecas especializadas o cuando se presentan problemas de ambigüedad entre productos.

1.2.5.1.3. Identificación por distancia en el espacio de las longitudes de onda

Existen diversas formas de definir la distancia entre objetos: euclídea, Manhattan, Minkowski,..., y cada una proporciona resultados distintos. La distancia euclídea es una de las más utilizadas. Aunque presenta como gran ventaja que es una “distancia natural”, es decir, fácilmente interpretable, tiene dos grandes limitaciones: la distancia entre dos objetos aumenta al aumentar el número de variables (aunque éstas no aporten información relevante) y depende de las unidades en que se expresan las variables. La dependencia de las unidades puede superarse escalando las variables; la forma más habitual de escalar es la de dividir por la desviación estándar.

Este método se basa en el cálculo de la distancia en el espacio de las longitudes de onda (*wavelength distance method*)⁵⁶, que asume implícitamente que las medidas a cada longitud de onda se distribuyen según la ley normal. Utilizando, generalmente, espectros de 2ª derivada, a partir del conjunto de espectros presentes en la biblioteca, que definen la variabilidad aceptada del producto, se calcula el espectro medio y la desviación estándar a cada longitud de onda. Para cada longitud de onda, se calcula la distancia entre la muestra desconocida y el espectro medio del producto de referencia, y se busca la situación más desfavorable, es decir, la longitud de onda que presenta la distancia máxima:

$$d_{kj} = \max \frac{|x_{kp} - \bar{x}_{jp}|}{s_{jp}} \quad (1.12)$$

donde los subíndices k y j indican, respectivamente, muestra y producto de referencia, x_{kp} es el valor espectral de la muestra k a la longitud de onda p , \bar{x}_{jp} es el espectro medio del producto de referencia j a la longitud de onda p y s_{jp} es la desviación estándar de los valores espectrales para el producto de referencia j a la longitud de onda p .

Las muestras desconocidas se identifican buscando el espectro medio del producto en la biblioteca que proporciona la distancia menor respecto al espectro de la muestra desconocida. Si ocurre que para el espectro de una muestra desconocida todas las distancias son mayores que el umbral preestablecido, la muestra no puede ser identificada positivamente. También puede llevarse a cabo la cualificación por distancia, debiendo ajustar los valores umbrales para cada producto de la biblioteca (las especificaciones dependen de cada producto).

Un criterio habitual de identificación positiva es $d_{\max} \leq 3 \sigma$ ⁵⁸, pero en general puede ser considerado como demasiado estricto (da lugar a falsos negativos), por lo que acostumbra a resultar más práctico determinar el valor límite para cada problema y método de trabajo.

La correcta utilización de este método requiere el control exhaustivo del instrumento que asegure que los niveles de ruido son siempre del mismo orden, ya que al utilizar medidas a longitudes de onda individuales es muy susceptible al ruido y a ligeros desplazamientos de las longitudes de onda.

Las ventajas fundamentales que presenta el método de la distancia en el espacio de las longitudes de onda son:

-Posibilidad de discriminar entre productos similares, gracias a que el algoritmo es sensible tanto a desplazamientos de las longitudes de onda como a variaciones de absorbancia.

-Permite tener en cuenta variaciones entre lotes u otras fuentes de variación, por lo que muestras que normalmente presentan una variación importante podrán ser identificadas correctamente si estas fuentes de variación han sido incluidas en la biblioteca; para productos que presentan una variabilidad muy pequeña, muestras con pequeños niveles de impurezas podrán ser detectados.

-Productos que no son identificados por correlación pueden ser identificados correctamente por distancia.

Una de las desventajas de este método es que necesita un número suficiente de muestras para cubrir la variabilidad del producto, pero su inconveniente fundamental es la posibilidad de generar falsos negativos en longitudes de onda que coinciden con los cortes del eje de abscisas de los espectros de 2ª derivada (*zero-crossover*). Si la desviación estándar del espectro medio, a una determinada longitud de onda, tiene valores muy pequeños se obtendrá un valor muy elevado de la distancia para esa longitud de onda y, por tanto, una identificación y/o cualificación negativa. Esto puede suceder cuando los valores de la 2ª derivada son muy cercanos a cero. Para solventar este problema, se ha propuesto el método de estabilización de bibliotecas⁵⁹ (*the wavelength library stabilization method*), mediante el cual el espectro medio y su desviación estándar se comportan como si cada uno de los espectros de 2ª derivada se hubiera desplazado una fracción de nanómetro, hacia la izquierda y hacia la derecha, en el eje de las longitudes de onda (*stabilization*

constant), de forma que el valor de la desviación estándar en los puntos *zero-crossover* aumenta y no se obtienen falsos negativos.

Diversos autores utilizan el método de la distancia en el espacio de las longitudes de onda, demostrando que es posible la detección de la presencia de impurezas^{60,61} o desviaciones químicas y/o físicas en la producción de un preparado farmacéutico⁶².

Una alternativa al método de la distancia en el espacio de las longitudes de onda es utilizar la distancia de Mahalanobis^{63,64}, que puede ser calculada para espacios multidimensionales. Esta distancia entre la muestra y el centro del grupo formado por los espectros de producto de referencia se define como:

$$D^2 = (\mathbf{X}_j - \bar{\mathbf{X}}_k)^T \mathbf{C}^{-1} (\mathbf{X}_j - \bar{\mathbf{X}}_k) \quad (1.13)$$

donde \mathbf{X}_j es el vector que describe el espectro de la muestra j , $\bar{\mathbf{X}}_k$ es el vector del espectro medio del producto de referencia k , \mathbf{C} es la matriz de covarianza y los superíndices T y -1 indican la matriz transpuesta y matriz inversa, respectivamente.

1.2.5.1.4. Identificación por varianza residual

Una alternativa al cálculo de la similitud en el espacio de las longitudes de onda es utilizar el análisis en componentes principales (PCA) como método de reducción de variables, previo al cálculo de la similitud. Uno de los métodos de identificación basados en componentes principales es el método de la varianza residual⁵⁸.

El método de la varianza residual consiste en un análisis en componentes principales individual para cada uno de los productos incluidos en la biblioteca. El número de componentes principales necesarios para definir cada uno de los productos generalmente se selecciona en base a la variabilidad total explicada por el modelo. En el análisis de una muestra desconocida se calcula la varianza residual del espectro de la muestra respecto a cada producto de la biblioteca en el espacio de los componentes principales (calculados al construir la biblioteca). Posteriormente, se asume que la varianza residual se distribuye de acuerdo con una función F , y, por tanto, se aplica una prueba de Fisher para estimar la probabilidad que la muestra pertenezca a la clase definida por los espectros del producto de referencia. Un valor bajo indicará una alta probabilidad que el espectro de la muestra

pertenezca al producto de referencia; por tanto, una muestra será identificada positivamente si su nivel de probabilidad está por debajo de un valor predeterminado.

Las principales ventajas que aporta el método de la varianza residual son:

- Alta capacidad discriminante y sensibilidad a pequeños cambios espectrales, lo que permite que sea utilizado para discriminar productos muy similares.
- Posibilidad de ser utilizado como método de identificación y cualificación.
- La expresión del resultado como un nivel de probabilidad permite definir con más facilidad un valor umbral para la identificación.

Por el contrario, sus principales desventajas son:

- Necesidad de disponer de un número elevado de espectros para definir cada uno de los productos, de forma que la variabilidad del mismo sea contemplada y pueda ser modelada.
- Al incluir o excluir un espectro en la biblioteca debe realizarse de nuevo el cálculo de los componentes principales y la validación de la biblioteca; este proceso, dependiendo del software utilizado, puede ser relativamente lento debido a la cantidad de información a procesar.
- Los softwares que acompañan a los equipos acostumbran a fijar un número máximo de componentes principales en el cálculo, lo que limita la aplicabilidad del método.

1.2.6. Análisis cuantitativo

Los métodos instrumentales de análisis son métodos relativos, en los que para determinar la cantidad de analito presente en la muestra es necesario comparar la propiedad medida con la de un conjunto de patrones de composición conocida.

Uno de los objetivos de los métodos quimiométricos es transformar la señal obtenida en el análisis instrumental (sin significación química) en información útil para el analista a través de lo que se conoce como **calibración**. Es por ello que la calibración, como etapa integrante del proceso analítico, es de gran importancia y sólo podrá obtenerse una buena precisión y exactitud en los resultados si se aplica el tipo de calibración adecuado y, evidentemente, de forma correcta.

En el ámbito de la química analítica se define calibración como el proceso que permite establecer la relación entre la respuesta instrumental y una propiedad determinada de la muestra, que en determinaciones cuantitativas suele ser la concentración. Esta relación matemática que relaciona la señal analítica con la concentración se denomina **modelo o ecuación de calibración** y la representación gráfica que los relaciona recibe el nombre de **curva de calibración**.

1.2.6.1. Clasificación de los métodos de calibración

Los métodos de calibración pueden clasificarse de diferentes maneras, en función del criterio que se utilice⁶⁵. Los más habituales se muestran en la tabla 1.2.

Tabla 1.2. Criterios para la clasificación de los métodos de calibración.

Criterio	Método de calibración
Dependiendo del número de variables	Univariable Multivariable
Dependiendo del tipo de función matemática	Lineal No Lineal
Dependiendo de la obtención de los parámetros de calibración	Directa Indirecta
Dependiendo de cual es la variable independiente	Clásica Inversa

En la calibración **univariable** se establece la relación matemática entre una única variable dependiente y una única variable independiente. Cuando intervienen más de una variable se denomina calibración **multivariable**. Las calibraciones **lineales** son las que relacionan las variables dependientes con funciones lineales de las variables independientes, o bien con funciones polinómicas que son lineales en los coeficientes. Cuando las funciones no son de este tipo se trata de calibraciones **no lineales**. Cuando los parámetros de calibración se conocen directamente a partir de la señal de cada uno de los analitos de forma individual la calibración es **directa**. Cuando los parámetros se conocen a partir de las señales analíticas de mezclas de los componentes, la calibración es **indirecta**.

En la calibración **clásica** la variable independiente es la concentración y la variable dependiente la señal analítica. En caso contrario estamos hablando de calibración **inversa**.

Dentro de la calibración multivariable, los modelos pueden clasificarse en dos grandes grupos: **métodos rígidos**, en los que es necesario tener información de todas las especies presentes que pueden contribuir a la señal, y **métodos flexibles**, en los que únicamente es necesario tener información de los analitos que se desea cuantificar, aunque hayan otras especies o fenómenos físicos que contribuyan a la señal registrada.

También se distingue entre métodos de **espectro completo**^{66,67} donde se utilizan tantas longitudes de onda como sea posible sin ninguna selección previa, o de **selección de variables**⁶⁸ en los cuales sólo se utilizan un número reducido de variables. Dentro de los métodos de espectro completo deben mencionarse los métodos de compresión de variables, basados en la descomposición de los datos en componentes principales.

1.2.6.2. Regresión lineal múltiple (MLR)

El método de regresión lineal múltiple (MLR *Multiple Lineal Regression*) fue introducido por Sternberg y colaboradores⁶⁹ en 1960. Calcula una relación lineal entre la señal y la concentración aplicando el método de mínimos cuadrados⁷⁰, y se utiliza tanto en calibración clásica como en calibración inversa.

1.2.6.2.1. Regresión lineal múltiple clásica (CLS)

Este método asume el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer para cada uno de los componentes de la mezcla en todo el intervalo de trabajo, así como la aditividad de las absorbancias en las mezclas. Se considera que el error en el modelo es debido a los datos espectrales.

Si tenemos una mezcla con P componentes que cumplen la ley de Beer y contribuyendo todos ellos a la señal registrada, la absorbancia a_j medida a la longitud de onda j puede escribirse como:

$$a_j = k_{j1}c_1 + k_{j2}c_2 + k_{j3}c_3 + \dots + k_{jp}c_p + e_j \quad (1.14)$$

donde c_i es la concentración del componente i , e_j el error aleatorio asociado a la medida y k_{ji} es la constante de proporcionalidad de cada uno de los componentes (producto del camino óptico y la absorptividad molar del componente i a la longitud de onda j).

Si se realizan medidas de absorbancia a K longitudes de onda, siendo $K \leq P$, se obtiene el sistema de K ecuaciones:

$$\begin{aligned}
 a_1 &= k_{11}c_1 + k_{12}c_2 + k_{13}c_3 + \dots + k_{1p}c_p + e_1 \\
 &\vdots \\
 a_j &= k_{j1}c_1 + k_{j2}c_2 + k_{j3}c_3 + \dots + k_{jp}c_p + e_j \\
 &\vdots \\
 a_K &= k_{K1}c_1 + k_{K2}c_2 + k_{K3}c_3 + \dots + k_{Kp}c_p + e_K
 \end{aligned}
 \tag{1.15}$$

que puede expresarse de forma matricial como:

$$\mathbf{a} = \mathbf{Kc} + \mathbf{e}
 \tag{1.16}$$

donde \mathbf{a} es el vector de las absorbancias de una muestra, de dimensiones $(K \times 1)$, \mathbf{K} la matriz de las constantes, de dimensiones $(K \times P)$, \mathbf{c} el vector de las concentraciones, de dimensiones $(P \times 1)$ y \mathbf{e} el vector de los residuales de las absorbancias que no ajustan correctamente el modelo, de dimensiones $(K \times 1)$.

Utilizando un modelo como el descrito hasta ahora se obliga a la ecuación a pasar por el origen, con lo que pequeñas diferencias en la línea base de los espectros repercuten en gran manera sobre los valores hallados. Para evitarlo es posible considerar una ordenada en el origen para el ajuste; se puede aumentar la dimensión de las matrices y añadir a la matriz \mathbf{K} una columna de unos y considerar una concentración c_0 que dé una medida de la desviación respecto al cero. De esta forma, la ecuación 1.14 puede describirse como:

$$a_j = k_{j0}c_0 + k_{j1}c_1 + k_{j2}c_2 + k_{j3}c_3 + \dots + k_{jp}c_p + e_j
 \tag{1.17}$$

siendo el valor de k_{j0} la unidad. Así, las matrices de la ecuación 1.16 se expresan como:

$$\mathbf{a} = \begin{pmatrix} a_1 \\ M \\ a_j \\ M \\ a_K \end{pmatrix} \quad \mathbf{K} = \begin{pmatrix} 1 & k_{11} & k_{12} & k_{13} & \Lambda & k_{1p} \\ M & M & M & M & & M \\ 1 & k_{j1} & k_{j2} & k_{j3} & \Lambda & k_{jp} \\ M & M & M & M & & M \\ 1 & k_{K1} & k_{K2} & k_{K3} & \Lambda & k_{KP} \end{pmatrix} \quad \mathbf{c} = \begin{pmatrix} c_0 \\ M \\ c_j \\ M \\ c_p \end{pmatrix} \quad \mathbf{e} = \begin{pmatrix} e_1 \\ M \\ e_j \\ M \\ e_K \end{pmatrix} \quad (1.18)$$

Dependiendo del método con que se calcula la matriz \mathbf{K} estaremos ante un método de calibración directa o indirecta.

En *calibración directa*, los valores de la matriz \mathbf{K} se pueden estimar a partir de los espectros de los componentes puros de la mezcla, de manera que, si el camino óptico es constante, cada columna de la matriz es el espectro del componente puro patrón, dividido por su concentración.

La concentración de los analitos presentes en la muestra se calcula aplicando una regresión por mínimos cuadrados que minimice la suma de cuadrados de los residuales (SCR):

$$SCR = \sum_{j=1}^K e_j^2 = \sum_{j=1}^K (a_j - \hat{a}_j)^2 = \sum_{j=1}^K \left(a_j - \sum_{i=0}^P K_{ji} \hat{c}_i \right)^2 \quad (1.19)$$

donde \hat{a}_j y \hat{c}_i indican respectivamente, absorbancia y concentraciones calculadas.

Las concentraciones no conocidas de una muestra pueden calcularse a partir de la expresión:

$$\hat{\mathbf{c}} = (\mathbf{K}^T \mathbf{K})^{-1} \mathbf{K}^T \mathbf{a} \quad (1.20)$$

donde $\hat{\mathbf{c}}$ es el vector de concentraciones calculado, \mathbf{a} es el vector de las absorbancias de la muestra y los superíndices T y -1 indican matriz transpuesta y matriz inversa, respectivamente.

La *calibración indirecta* se efectúa utilizando mezclas de todos los componentes. Si se utilizan M muestras de calibración (siendo $M > P$) se tiene una matriz de absorbancia \mathbf{A} de dimensiones $(K \times M)$ y una matriz de concentraciones \mathbf{C} de dimensiones $(P \times M)$ y la ecuación 1.16 puede escribirse como:

$$\mathbf{A} = \mathbf{K}\mathbf{C} + \mathbf{E} \quad (1.21)$$

siendo \mathbf{E} la matriz de los residuales de las absorbancias que no ajustan correctamente el modelo, de dimensiones $(K \times M)$, y \mathbf{K} la matriz de constantes, de dimensiones $(K \times P)$, que se debe estimar en la calibración.

Los valores de la matriz \mathbf{K} son estimados por mínimos cuadrados, minimizando la suma de los cuadrados de los errores espectrales. En la calibración, la solución de la ecuación anterior por mínimos cuadrados es:

$$\hat{\mathbf{K}} = \mathbf{A}\mathbf{C}^T (\mathbf{C}^T\mathbf{C})^{-1} \quad (1.22)$$

donde $\hat{\mathbf{K}}$ es el valor estimado de \mathbf{K} . Conocida la matriz \mathbf{K} , la predicción de una muestra de concentración desconocida se efectúa mediante la ecuación 1.20.

Puesto que estos métodos son de espectro completo, pueden proporcionar mejoras en la precisión frente a otros métodos en los que se trabaja con un número limitado de variables⁶⁷ y se pueden aplicar a la determinación simultánea de analitos si se conocen todos los componentes que contribuyen a la señal analítica, incluidas las interferencias.

La precisión de las concentraciones estimadas viene determinada por la precisión de las medidas de absorbancia y por la validez del método elegido. Es también muy importante la "calidad" de la matriz \mathbf{K} . Los espectros de los analitos han de ser razonablemente distintos, ya que si están muy solapados provocan gran colinealidad^a de las columnas de la matriz y dificultan el cálculo de la inversa de $\mathbf{K}^T\mathbf{K}$. Por otra parte, el intervalo de longitudes de onda elegido influye en el número de filas de la matriz; cuando se trata de longitudes de onda discretas, éstas han de estar bien seleccionadas, conteniendo cada una de ellas la máxima información posible de todos los componentes. Si se trata de espectros completos, las longitudes de onda pueden estar muy correlacionadas y se ha de escoger el intervalo que produzca una cuantificación más exacta. Existen diversos métodos para elegir un

^a En términos matemáticos una matriz es colineal si las columnas son aproximada o exactamente linealmente dependientes. Si hay una exacta dependencia lineal, la inversión de la matriz no es posible y la estimación por mínimos cuadrados no será única. Generalmente, la combinación lineal no será exacta, pero se sigue hablando de colinealidad. La matriz de los componentes puros patrón será más o menos colineal dependiendo de lo parecido que sean sus espectros. Cuando más parecidos sean, más errores llevará la inversión y peores resultados se obtendrán puesto que en mínimos cuadrados la colinealidad provoca una mayor varianza de los parámetros de la regresión, lo que afecta a la precisión de los valores a estimar.

intervalo óptimo de longitudes de onda y todos ellos presentan importantes restricciones o limitaciones⁷¹, por lo que lo más sencillo suele ser utilizar un método empírico y escoger el intervalo que proporciona un error menor en la cuantificación de muestras de concentración conocida.

1.2.6.2.2. Regresión lineal múltiple inversa (ILS)

El método de regresión lineal múltiple inversa o ILS (*Inverse Least-Squares*)⁷² asume que la concentración es función de la absorbancia y que el error del modelo es debido a las concentraciones. El modelo sigue la ecuación inversa de la ley de Beer, y la regresión se escribe como:

$$c_i = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + \dots + b_{K-1} x_{K-1} + e_i \quad (1.23)$$

donde la concentración actúa como variable dependiente (c_i), mientras que los valores espectrales, registrados a distintas longitudes de onda, como variables independientes (x_k).

Si se desea conocer la concentración de mezclas que contienen P analitos, para construir la calibración se registrarán los espectros de M muestras de mezclas de los analitos, para posteriormente resolver la ecuación siguiente:

$$\mathbf{C} = \mathbf{X}\mathbf{B} + \mathbf{E} \quad (1.24)$$

donde \mathbf{C} es la matriz de las concentraciones, de dimensiones ($M \times P$), \mathbf{X} la matriz de la señal analítica, de dimensiones ($M \times K$), \mathbf{E} la matriz de los residuales aleatorios de las concentraciones, de dimensiones ($M \times P$) y \mathbf{B} la matriz de regresores desconocida que se calcula a partir del calibrado, de dimensiones ($K \times P$).

La matriz \mathbf{B} se estima por mínimos cuadrados, minimizando el cuadrado de los errores en las concentraciones, ya que el modelo asume que el error está en las concentraciones. La solución por mínimos cuadrados de la ecuación de calibración es:

$$\hat{\mathbf{B}} = (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \mathbf{C} \quad (1.25)$$

donde los superíndices T y -1 las matrices transpuesta e inversa, respectivamente.

Una vez calculada la matriz $\hat{\mathbf{B}}$, las concentraciones de los diferentes analitos \mathbf{c} para una nueva muestra se pueden hallar a partir de los datos espectrales \mathbf{x} de la muestra según:

$$\hat{\mathbf{c}}^T = \mathbf{x}^T \hat{\mathbf{B}} \quad (1.26)$$

La utilización de la calibración ILS presenta la ventaja de que no es necesario conocer todas las especies absorbentes de la mezcla para la cuantificación de los P analitos de interés. Sin embargo, los componentes no incluidos en la cuantificación deben estar presentes en todas las muestras y son modelados implícitamente. Esta característica ha hecho que el ILS sea ampliamente utilizado como método de calibración en espectroscopia, especialmente en IR medio y próximo^{73,74}, aunque en la actualidad existe una tendencia a la utilización de métodos de reducción de variables.

Conceptualmente este modelo asume que los espectros presentan un comportamiento lineal, el ruido asociado a éstos es pequeño y no hay interferencias o interacciones entre el analito y otros componentes de la muestra⁷⁵. Sin embargo, es capaz de modelar algunas no linealidades puesto que asume que el error en el modelo proviene de las concentraciones⁷⁶.

La mayor desventaja de ILS es que el número de variables no puede ser mayor que el número de muestras, por lo que el modelo se restringe únicamente a unas pocas longitudes de onda. Seleccionar cuántas y cuáles serán las variables a utilizar es una cuestión complicada, especialmente en problemas complejos⁷⁷. Se recomienda⁷³ la utilización de 5 a 10 muestras por parámetro a ajustar en la regresión, incluyendo el término independiente. Además, cuando se utiliza un número elevado de variables se pueden tener los mismos problemas de colinealidad que mediante la calibración clásica, lo que disminuye la precisión de los resultados⁷⁸.

En espectroscopia NIR, la restricción de un número limitado de longitudes de onda ha convertido al ILS en el método óptimo cuando se trabaja con instrumentos de filtros. El problema se presenta cuando se trabaja con instrumentos de barrido completo, puesto que una incorrecta selección de las longitudes de onda puede implicar pérdida de información relevante y/o un sobreajuste en el modelo de calibración.

1.2.6.3. Métodos de calibración basados en la reducción de variables

Son métodos inversos e indirectos, por lo que posibilitan cuantificar un analito en una mezcla sin necesidad de conocer los otros componentes de la misma. Se basan en que la información contenida en las variables medidas se puede concentrar en un número menor de variables (componentes principales) sin pérdida de información relevante. La regresión no se hace sobre los datos originales, sino sobre estas nuevas variables, simplificando el modelo y la interpretación de los resultados. Por otra parte, este tipo de métodos son de espectro completo, es decir, pueden utilizar todas las variables a las que se ha registrado el espectro sin necesidad de una selección previa.

Estos métodos no presentan problemas de colinealidad y las consecuencias derivadas de ella, y es posible utilizar más longitudes de onda (es decir, más información) que en ILS, por lo que actualmente se tiende a utilizarlos.

Por otra parte, los procedimientos de reducción de variables no se suelen aplicar directamente a los datos originales, sino que éstos son centrados o autoescalados de la misma manera que la descrita en el apartado 1.2.4.1.

1.2.6.3.1. Regresión en componentes principales (PCR)

La regresión en componentes principal (PCR, *Principal Component Regression*) aprovecha las propiedades de la descomposición en componentes principales y, puesto que los scores de la matriz \mathbf{X} contienen la misma información que la matriz original, pero habiendo eliminado el ruido, el método PCR realiza una regresión múltiple inversa (ILS) de la propiedad a determinar sobre los scores en lugar de realizarla sobre los datos originales.

Supongamos que cada muestra presenta p analitos. Entonces para cada muestra tendremos p variables y_1, y_2, \dots, y_p referidas a la concentración. Esto permite definir un vector de concentraciones \mathbf{y} , ($\mathbf{y} = y_1, y_2, \dots, y_p$) que describe la concentración de cada uno de los p componentes de la muestra. El espectro de cada una de las muestras viene dado por la absorbancia que ésta presenta a cada una de las k longitudes de onda. Por tanto, cada muestra se define por un vector \mathbf{x} que contiene k variables independientes ($\mathbf{x} = x_1, x_2, \dots, x_k$). Cuando se construye un conjunto de calibración con m muestras, el sistema se puede describir mediante dos matrices: una matriz \mathbf{X} , que contiene datos espectrales (de dimensión $m \times k$) y una matriz \mathbf{Y} de concentraciones (de dimensión $m \times p$).

El primer paso que se realiza es una descomposición de la matriz \mathbf{X} en sus componentes principales, mediante un PCA.

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} = \sum_{a=1}^A \mathbf{t}_a \mathbf{p}_a^T + \mathbf{E} \quad (1.27)$$

Una vez escogido el número A de componentes principales óptimo para describir la matriz \mathbf{X} , ésta se puede representar por su matriz de scores \mathbf{T}

$$\mathbf{T} = \mathbf{XP} \quad (1.28)$$

Ahora se puede calcular la matriz de \mathbf{Y} según

$$\mathbf{Y} = \mathbf{T}\hat{\mathbf{B}} + \mathbf{E} \quad (1.29)$$

donde $\hat{\mathbf{B}}$ es la matriz de regresores que se calcula a través de la pseudoinversa de \mathbf{T} y conociendo los valores de \mathbf{Y} del conjunto de calibración

$$\hat{\mathbf{B}} = (\mathbf{T}^T \mathbf{T})^{-1} \mathbf{T}^T \mathbf{Y} \quad (1.30)$$

Una vez establecido el modelo de calibración, se pueden realizar los cálculos para predecir un conjunto de nuevas muestras. En primer lugar, la matriz de los datos espectroscópicos del conjunto de muestras de predicción, \mathbf{X}^* , se centra o autoescala utilizando los valores calculados a partir de la matriz de datos, \mathbf{X} , empleada en la calibración. A partir de la matriz de loadings \mathbf{P} calculada en la calibración, para A componentes óptimos, se calculan los scores de las muestras de predicción, \mathbf{T}^*

$$\mathbf{T}^* = \mathbf{X}^* \mathbf{P} \quad (1.31)$$

y se utiliza la matriz de regresores $\hat{\mathbf{B}}$ también calculada en la calibración, junto con los scores de estas muestras, para el cálculo de la propiedad a determinar en las muestras desconocidas

$$\mathbf{Y} = \mathbf{T}^* \hat{\mathbf{B}} \quad (1.32)$$

Uno de los principales problemas con PCR es que los componentes principales que mejor representan la matriz de los datos espectroscópicos, \mathbf{X} , pueden no ser los óptimos para la predicción de las concentraciones de los analitos que queremos determinar. Por este motivo

se ha desarrollado otra técnica de calibración que intenta concentrar el máximo poder predictivo en los primeros componentes principales. Este nuevo método es la regresión parcial por mínimos cuadrados.

1.2.6.3.2. Regresión parcial por mínimos cuadrados (PLSR)

El método de calibración por regresión parcial por mínimos cuadrados (PLSR, *Partial Least Squares Regression*) fue introducido por H. Wold en 1975⁷⁹ y la diferencia con el PCR radica en que, en este caso, se intenta que los primeros componentes principales contengan la mayor información para la predicción de las muestras. Para ello, durante la etapa de calibración, el algoritmo PLSR utiliza tanto la información de la matriz de los datos espectroscópicos (matriz \mathbf{X}) como la información de la matriz de concentraciones (matriz \mathbf{Y}) obteniéndose unas variables auxiliares llamadas variables latentes, factores o componentes.

Antes de realizar la descomposición en componentes, las matrices \mathbf{X} e \mathbf{Y} se centran o autoescalan, como en el caso del PCA. Cada una de las matrices se descompone en una suma de A componentes, donde $A < K$ y K es el número de variables originales de la matriz \mathbf{X} , de forma que simultáneamente se calcula:

$$\begin{aligned}\mathbf{X} &= \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} = \sum_{a=1}^A t_a \mathbf{p}_a^T + \mathbf{E} \\ \mathbf{Y} &= \mathbf{UQ}^T + \mathbf{F} = \sum_{a=1}^A u_a \mathbf{q}_a^T + \mathbf{F}\end{aligned}\tag{1.33}$$

donde \mathbf{T} es la matriz de scores, \mathbf{P} la de loadings y \mathbf{E} la matriz de residuales para la matriz de los datos y \mathbf{U} es la matriz de scores, \mathbf{Q} la matriz de loadings y \mathbf{F} la matriz de residuales para la matriz de concentraciones. Si tenemos M muestras, A componentes, K variables y P analitos, la dimensionalidad de las matrices es: \mathbf{T} y \mathbf{U} ($M \times A$), \mathbf{P}^T y \mathbf{Q}^T ($A \times K$) y ($A \times P$) respectivamente.

En este caso los loadings no coinciden exactamente con la dirección de máxima variabilidad de las muestras, como en el caso del PCA, puesto que están corregidos para obtener la máxima capacidad predictiva para la matriz \mathbf{Y} .

La descomposición de ambas matrices no es independiente, se realiza de forma simultánea, estableciéndose una relación interna entre los scores de los bloques \mathbf{X} e \mathbf{Y} de forma que, para cada componente a , se cumpla que:

$$\hat{u}_a = \mathbf{b}_a t_a \quad (1.34)$$

donde \mathbf{b}_a es el coeficiente de regresión para cada uno de los componentes.

A partir de aquí se calcula el valor de \mathbf{Y} utilizando la relación interna \hat{u}_a

$$\mathbf{Y} = \mathbf{TBQ}^T + \mathbf{F} \quad (1.35)$$

siendo \mathbf{B} la matriz de los regresores b_a , de dimensiones $(A \times A)$, y \mathbf{F} la matriz de los residuales de \mathbf{Y} .

En el caso de calcular una sola concentración de la matriz \mathbf{Y} el algoritmo recibe el nombre de PLSR1 y se puede considerar una simplificación del algoritmo global, también conocido como PLSR2.

Una vez establecido el modelo de calibración se puede realizar la predicción de la concentración de un nuevo conjunto de muestras. Así pues, si el espectro de una muestra viene dado por el vector \mathbf{x}_i , las concentraciones de los analitos \mathbf{y}_i se pueden determinar mediante la siguiente expresión:

$$\mathbf{y}_i^T = \hat{\mathbf{b}}_0^T + \mathbf{x}_i^T \hat{\mathbf{B}} \quad (1.36)$$

donde la matriz de regresores $\hat{\mathbf{B}}$ y el vector $\hat{\mathbf{b}}_0^T$ permiten realizar la predicción sin necesidad de descomponer su espectro en matrices de *scores* y *loadings*.

1.2.6.3.3. Evaluación de la capacidad predictiva de un modelo

El objetivo de la calibración es obtener los parámetros que permitan calcular la concentración en futuras muestras de forma que la diferencia entre el valor predicho y el valor real o de referencia, es decir, el residual, sea lo menor posible.

Para poder asegurar la bondad de un modelo en la predicción de muestras distintas a las utilizadas en la calibración, es necesario realizar un proceso de validación del mismo

que consiste en el estudio cuantitativo de los resultados de la aplicación del modelo construido a nuevas muestras.

Esta validación puede ser un *proceso externo*, utilizando un conjunto de muestras independientes de las utilizadas en el calibrado, pero representativo del mismo y de las futuras muestras a analizar, denominado conjunto de validación. La concentración de las muestras del bloque de validación es conocida y, por tanto, es posible comprobar cómo se comporta el modelo propuesto en el cálculo de concentraciones de muestras distintas a las utilizadas en la construcción del mismo.

También se utiliza un *proceso interno* o *cross-validation*, que a diferencia de lo que ocurre con los métodos clásicos para averiguar el modelo que mejor ajusta los datos de calibración, tiene en cuenta que el objetivo es diseñar un modelo con una buena capacidad predictiva en muestras distintas a las utilizadas en el calibrado^{80,81}. Por este método, se divide el conjunto de muestras de la calibración en varios segmentos; el modelo se construye tantas veces como número de segmentos se ha elegido, utilizando un segmento como bloque de datos para comprobar resultados y el resto para construir el modelo, de forma que cada vez se deje un segmento fuera. El número de muestras que se utilizan en cada segmento de validación es variable; el caso extremo es utilizar sólo una muestra (método *leave-one-out*) de tal manera que, al final, todas las muestras que están presentes en el bloque de calibrado han sido excluidas y validadas.

Para evaluar esta capacidad predictiva se suele utilizar el sumatorio del cuadrado de los residuales, $(\sum(\hat{y}-y)^2)$, denominado habitualmente PRESS (*Predicted Residual Error Sum of Squares*) o su valor medio obtenido dividiendo el PRESS por el número de muestras, MSE (*Mean Squared Error*). Matemáticamente los valores MSE son muy tratables, pero se suele utilizar la raíz cuadrada de este valor dado que tiene las mismas unidades en que se mide y , es el denominado RMSE (*Root Mean Squared Error*), el cual se calcula tanto para las muestras de calibración, RMSEC (*Root Mean Squared Error of Calibration*) como para las de predicción, RMSEP (*Root Mean Squared Error of Prediction*).

Para cada componente a se calcula la varianza de predicción (error cuadrático medio corregido por los grados de libertad) de cada uno de los segmentos de *cross-validation*. Si hay N muestras en el segmento de *cross-validation* estudiado, la varianza de predicción $(\text{MSECV})_{p,a}$ para cada analito p vale:

$$MSECV_{p,a} = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_{hij} - y_{hij})^2}{N} \quad (1.37)$$

donde y es la concentración de referencia e \hat{y} la concentración calculada.

La varianza residual de las Y del bloque de cross-validation $(MSECV)_{tot,a}$, considerando p variables en el bloque Y vale:

$$MSECV_{tot,a} = \frac{\sum_{j=1}^p \sum_{i=1}^N (\hat{y}_{hij} - y_{hij})^2}{Np} \quad (1.38)$$

Una vez calculados todos los segmentos se suman, para cada componente, los valores de MSECV de cada uno de ellos, con lo que se consigue una buena estimación del poder predictivo de las muestras de calibración.

Para comparar la capacidad predictiva de distintos modelos se puede utilizar la raíz del error estándar relativo de predicción RSEP (*Relative Standard Error of Prediction*):

$$RSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^M (\hat{y}_{ij} - y_{ij})^2}{\sum_{i=1}^M y_{ij}^2}} \quad (1.39)$$

donde M es el número de muestras, y_{ij} es la concentración del analito j -ésimo en la muestra i -ésima e \hat{y}_{ij} es el estimado.

Este error estándar relativo de predicción, RSEP, se calcula tanto para las muestras de calibración como para las muestras del conjunto externo, obteniéndose el RSEP(C) y el RSEP(P) respectivamente.

1.2.6.3.4. Elección del número de componentes principales

La elección del número de componentes principales que configura el modelo óptimo es el punto clave en la utilización de cualquier técnica de calibración que realice una reducción de variables. Se han propuesto múltiples formas para reducir el número de componentes, que se basan, en general, en el análisis del error de predicción al utilizar distinto número de éstos. Algunas de ellas han sido descritas por Malinowsky⁸².

El método sugerido por S. Wold⁸¹ consiste en representar el valor de PRESS frente al número de componentes y buscar el mínimo. Este criterio parte de la idea de que el error disminuye al aumentar el número de componentes que se utilizan en el modelo, hasta que llega un momento en que los nuevos componentes introducidos únicamente explican ruido y el PRESS aumenta debido al sobreajuste del modelo. Aunque es una idea razonable, el hecho de utilizar únicamente un número limitado de muestras (como máximo todas las presentes en el conjunto de calibración) hace que el modelo esté sujeto a error y que genere un sobreajuste de los datos⁸³. Otros autores prefieren utilizar el primer mínimo local que aparece en la representación PRESS frente al número de componentes⁶⁵, aunque puede ser que en este caso se produzca un subajuste de los datos.

El método descrito por Haaland y Thomas⁸⁴ escoge el número de componentes cuyo PRESS no es significativamente más grande que el mínimo PRESS del modelo, evitando así el sobreajuste. El mínimo valor del PRESS vendrá dado por un número de componentes que denominamos a^* . Cada valor de PRESS obtenido con un número de componentes menor al a^* se compara con el valor de $PRESS_{a^*}$ mediante una prueba Fisher. Esquemáticamente el algoritmo es el siguiente:

1. Calcular para cada componente $a=1, 2, \dots, a^*$

$$F(a) = \frac{PRESS(\text{modelo con } a \text{ componente } s)}{PRESS(\text{modelo con } a^* \text{ componente } s)} \quad (1.40)$$

2. Elegir como número de componentes óptimo el menor a tal que $F(a) < F_{; gdl; gdl}$ donde $F_{; gdl; gdl}$ es el valor tabulado para una prueba F unilateral con un porcentaje de nivel de significación de $(1-)$. Basándonos en un criterio meramente empírico, el valor de recomendado por Haaland y Thomas es 0.25. Los grados de libertad del numerador y denominador son los mismos (m en el caso de PLSR1 y mp en el caso de PLSR2, siendo m el número de muestras y p el número de analitos).

1.3. CONTROL DE CALIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

1.3.1. Introducción

La Norma Standard ISO E 8402: 1994 de la Organización Internacional para la Estandarización define calidad como *la totalidad de las características de un producto o servicio que le confieren aptitud para satisfacer unas necesidades establecidas e implícitas.*

Aún si todas esas “necesidades” pudieran ser identificadas y adecuadamente definidas, ¿qué sucedería con el llamado “nivel aceptable de calidad” (AQL *acceptable quality level*) que es el máximo porcentaje de unidades de servicio o productos fallados que podrían ser considerados como aceptables para el proceso promedio?, o en otras palabras, ¿cuántos errores se pueden cometer y estar todavía produciendo un servicio o producto de “calidad”?

Quizás la definición más sencilla de Calidad está inspirada por el trabajo de W. Edwards Deming⁸⁵, uno de los precursores de la Calidad en la industria. En su enunciado más básico, proveer de buena calidad significa *realizar las cosas correctas de manera correcta.* En el ámbito de la salud también significa ofrecer un conjunto de servicios que sean seguros y efectivos y satisfagan las necesidades y expectativas de los consumidores.

La Organización Mundial de la Salud tratando de abarcar la perspectiva de los distintos grupos involucrados, define la Calidad en la Atención en Salud como *la apropiada ejecución (de acuerdo a estándares) de intervenciones de probada seguridad, que son económicamente accesibles a la población en cuestión, y que poseen la capacidad de producir un impacto positivo en la mortalidad, morbilidad, discapacidad y malnutrición.*

En el ámbito de la industria farmacéutica se mantiene un elevado nivel de Garantía de Calidad en el desarrollo, control y fabricación de medicamentos. El sistema de autorizaciones de comercialización garantiza que todos los medicamentos sean evaluados por una autoridad competente para asegurar el cumplimiento de los niveles requeridos de seguridad, calidad y eficacia. Por otro lado, también garantiza que todos los productos autorizados son fabricados solamente por fabricantes autorizados, cuyas actividades son inspeccionadas periódicamente por autoridades competentes.

1.3.2. Evolución histórica de la normativa en el siglo XX

En EEUU, la Federal Pure Food and Drug Act de 1906 legislaba sobre el transporte interestatal de alimentos y medicamentos adulterados. Bajo esta ley, las compañías farmacéuticas no tenían obligación de establecer ni la eficacia ni la seguridad de los medicamentos que comercializaban. En 1938 murieron en los EEUU más de 100 niños como consecuencia de la comercialización de una solución de sulfanilamida en dietilenglicol, un excelente solvente pero muy tóxico. Este hecho dio origen ese mismo año a la enmienda del acta federal de 1906, a partir de la cual se incluyó el concepto de seguridad de los medicamentos, siendo la FDA (Food and Drug Administration) encargada de su aplicación. Se comenzaron a exigir estudios de toxicidad así como la aprobación de la solicitud previa de nuevo fármaco (New Drug Application, NDA) antes que el medicamento pudiera ser promocionado y distribuido. Sin embargo, aún no se exigía ninguna prueba de la eficacia de un medicamento para concederle permiso de comercialización y, además, un medicamento pasaba de la etapa de investigación animal a la investigación clínica sin la aprobación de la FDA.

El otro suceso más significativo en la historia de la FDA se ubica en la década de los 60 y se relaciona con el desastre de la talidomida. La reacción frente a la dramática demostración de teratogenicidad de un medicamento promovido para ser usado en el primer trimestre del embarazo dio la vuelta al mundo y, en los EEUU, la respuesta fue la enmienda Harris-Kefauver al acta de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos en 1962. Esta enmienda requiere que se presente suficiente investigación farmacológica y toxicológica en animales antes que un nuevo fármaco pueda ser probado en humanos. Antes de comenzar los estudios clínicos se deben enviar datos de estas investigaciones a la FDA en un formulario de solicitud de Nuevo Fármaco de Investigación (Investigational New Drug, IND). También se exige a los productos presentados después de 1962 pruebas de la eficacia y documentación que demuestre la seguridad relativa del nuevo fármaco, en términos de la relación riesgo/beneficio. Los nuevos requerimientos de esta enmienda determinaron que el tiempo total de desarrollo de un nuevo medicamento se extendiera de 8 a 9 años. En los últimos años la FDA se ha visto envuelta en un debate con grupos de consumidores y las compañías farmacéuticas en relación a la demora en la aprobación de fármacos para enfermedades con riesgo vital. En este clima, la FDA se encontró ante la difícil tarea de equilibrar, por una lado, su misión de garantizar la seguridad y eficacia de los nuevos medicamentos y, por otro, la necesidad de la sociedad de disponer de medicamentos útiles en un tiempo razonable.

En 1984 se sancionó la Drug Price Competition and Patent Restoration Act también conocida como Acta Hatch-Waxman. A diferencia de las enmiendas normativas previas que surgieron como respuesta a problemas de salud pública, ésta surge como respuesta a factores económicos. Los legisladores dejan en claro, por primera vez, el papel clave que juegan los medicamentos genéricos en la regulación del gasto en medicamentos del Sistema de Salud.

Por último la normativa sobre las "Orphan drugs" y el "Acta de Modernización" de la FDA de 1997 son ejemplos del delicado equilibrio que la agencia debe mantener entre las demandas del público consumidor y las presiones de la industria farmacéutica.

En el ámbito europeo la primera directiva referente a medicamentos fue aprobada por el consejo de ministros de la Comunidad Económica Europea (CEE) en 1965 (65/65/CEE). Posteriormente en 1975 se aprueba la normativa referente al organismo regulador Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Desde la constitución formal de la Unión Europea (UE) en 1995, los organismos normativos del medicamento de los miembros de la antigua comunidad se han agrupado en la Agencia Europea de Evaluación de Medicamentos (EMA, *European Medicines Evaluation Agency*). Los gobiernos europeos y la industria farmacéutica coincidieron en un punto de común interés: poner en el mercado medicamentos seguros y eficaces en el menor tiempo posible para el beneficio de los pacientes.

En el año 1990 se publica, en España, la Ley del Medicamento, la cual supone una inflexión importante para el mundo farmacéutico, ya que a partir de la misma, se promulgan decretos y órdenes ministeriales para adaptar la legislación española a la de la Comunidad Económica Europea. Se promulgan, también, leyes y disposiciones legales de menor rango en muchas comunidades autónomas con competencias en ordenación farmacéutica⁸⁶. Es, por tanto, una novedad legislativa, puesto que las únicas normas con rango de Ley relativas a esta materia se hallaban, en la Ley de Bases de Sanidad Nacional de 1944 y en la Ley General de Sanidad de 1986. El objetivo de esta Ley es la obtención de medicamentos seguros, eficaces y de calidad, correctamente identificados y con información apropiada⁸⁷.

En 1997 se crea la Agencia Española del Medicamento, la cual unifica por primera vez en un organismo las actividades de evaluación, autorización, registro y control de los medicamentos de uso humano y veterinario. Es un organismo autónomo, con personalidad jurídico-pública diferenciada y plena capacidad de actuar, adscrita al Ministerio de Sanidad y Consumo a través de la Subsecretaría del Departamento, que sigue las directrices del

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación en lo relacionado al medicamento veterinario.

El Estatuto de la Agencia, establece como objetivo esencial, garantizar que los medicamentos autorizados y registrados en España respondan a estrictos criterios de calidad, seguridad y eficacia, de acuerdo con la normativa sobre medicamentos de la Unión Europea y lo establecido en la Ley 14/1986 General de Sanidad, en la Ley 25/1990 del Medicamento y en las disposiciones que las desarrollan.

Con la creación de la Agencia se separan orgánica y funcionalmente las tareas científicas y de autorización de medicamentos, competencia de la Agencia, de aquellas otras ligadas a la gestión del Sistema Nacional de Salud, como son las condiciones de financiación y precio de los medicamentos, competencia de la Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios.

1.3.3. Gestión de la calidad

Una vez obtenida la autorización de fabricación, el titular de la misma debe fabricar los medicamentos asegurando que éstos son adecuados para su uso previsto, cumplen los requisitos de la autorización de comercialización y no exponen a los pacientes a riesgos debidos a defectos en la seguridad, calidad o eficacia. El logro de este objetivo de calidad es responsabilidad de la dirección de la empresa y exige la participación y el compromiso del personal de muchos departamentos diferentes, de los proveedores y de los distribuidores de la misma. Para conseguir el objetivo de calidad de forma fiable es necesaria la existencia de un sistema de garantía de calidad, diseñado globalmente y aplicado de forma adecuada, según Las Normas de Correcta Fabricación y de Control de Calidad. Este sistema debe estar documentado en todos sus aspectos y es necesario verificar su efectividad. Todas las partes del sistema de Garantía de Calidad deben estar dotadas de forma conveniente de personal competente y de locales, equipos e instalaciones adecuadas y suficientes⁸⁸.

Los conceptos básicos de Garantía de Calidad, Normas de Correcta Fabricación y Control de Calidad guardan una estrecha relación entre sí.

1.3.3.1. *Garantía de Calidad*

La garantía de calidad es un concepto que se refiere a todos los temas que afectan, individual o colectivamente, a la calidad de un producto. Consiste en la suma total de las actividades organizadas con el objetivo de garantizar que los medicamentos posean la calidad requerida para su uso previsto.

El sistema de Garantía de Calidad adecuado para la fabricación de medicamentos debe asegurar que⁸⁸:

- Los medicamentos se diseñen y desarrollen de forma que tengan en cuenta las Normas de Correcta Fabricación y las Buenas Prácticas de Laboratorio.
- Las operaciones de producción y control estén claramente especificadas, así como las responsabilidades del personal directivo.
- Se tomen medidas para la fabricación, abastecimiento y utilización de los materiales correctos de partida y de acondicionamiento.
- Se realicen todos los controles necesarios de los productos intermedios y cualquier otro tipo de controles durante el proceso y validaciones.
- El producto terminado se elabore y controle de forma correcta, según procedimientos definidos.
- Los medicamentos no se vendan o suministren antes de que una persona cualificada haya certificado que cada lote de producción se ha producido y controlado de acuerdo con cualquier tipo de disposiciones relativas a la producción, control y aprobación de medicamentos.
- Existan disposiciones adecuadas para garantizar, en la medida de lo posible, que los medicamentos se almacenen, distribuyan y manipulen posteriormente, de forma que su calidad se mantenga íntegra hasta la fecha de caducidad.
- Haya un procedimiento de autoinspección y/o auditoría de la calidad que evalúe periódicamente la efectividad y aplicabilidad del sistema de Garantía de Calidad.

1.3.3.2. *Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos*

Las normas de correcta fabricación (NCF) son la parte de Garantía de Calidad que garantiza que los productos se producen de forma homogénea y se controlan para

conseguir los niveles de calidad adecuados a su uso previsto, de acuerdo con los requisitos de la Autorización de Comercialización.

Estas normas se refieren tanto a la producción como al control de calidad. Los requisitos básicos son⁸⁸:

-Todos los procesos de fabricación deben definirse claramente y revisarse de forma sistemática teniendo en cuenta la experiencia, y demostrar que son capaces de fabricar de forma homogénea medicamentos de la calidad necesaria y que éstos cumplan sus especificaciones.

-Las fases críticas de los procesos de fabricación y los cambios significativos de dichos procesos deben estar validados.

-Disposición de todo lo necesario para el cumplimiento de las NCF, como es el personal cualificado, espacio y locales adecuados, equipos y servicios convenientes, materiales, envases y etiquetas correctos, instrucciones y procedimientos aprobados, y almacenamiento y transporte apropiados.

-Las instrucciones y procedimientos deben estar escritos en una hoja de instrucciones con un lenguaje claro e inequívoco, aplicable específicamente a las instalaciones de que se disponga.

-Necesidad de formar a los operarios para que realicen los procedimientos de forma correcta.

-Necesidad de registrar datos durante la fabricación, de forma manual y/o mediante instrumentos de registro, para demostrar que se cumplen en la realidad todas las fases requeridas por los procedimientos e instrucciones definidas, y que la cantidad y calidad del producto es la prevista. Es necesario registrar e investigar a fondo cualquier desviación significativa.

-Conservación de forma íntegra y accesible de un protocolo de fabricación, además de los datos de distribución, que permita reconstruir la historia completa de un lote.

-La distribución de los productos a mayoristas debe minimizar el riesgo de disminuir la calidad.

-Disposición de un sistema de retirada de los lotes de producto, a partir de sus puntos de distribución y venta.

-Necesidad de examinar las reclamaciones sobre los productos comercializados, investigando las causas de los defectos de calidad y tomando las medidas convenientes respecto a los productos defectuosos, para evitar así la repetición de estos casos.

1.3.3.3. Control de calidad

El control de calidad es la parte de las NCF que se refiere al muestreo, especificaciones y ensayos, así como a la organización, documentación y procedimientos de aprobación que garanticen la realización de los ensayos pertinentes y necesarios y la no aprobación de los materiales para su uso ni de los productos para su venta o distribución hasta que su calidad haya sido considerada satisfactoria. El control de calidad no se limita a operaciones de laboratorio, sino que debe intervenir en todas las decisiones que puedan afectar a la calidad del producto. La independencia del control de calidad respecto a la producción se considera fundamental para el funcionamiento satisfactorio del mismo.

Los requisitos básicos son⁸⁸:

-Disposición de las instalaciones, personal cualificado y procedimientos aprobados necesarios para la realización del muestreo, inspección y control de los materiales de partida, materiales de acondicionamiento, productos intermedios, a granel y terminados, y, en su caso, para controlar las condiciones ambientales para cumplir las NCF.

-El muestreo de los materiales de partida, de acondicionamiento, productos intermedios, a granel y terminados, se realiza por personal y métodos aprobados por el control de calidad.

-Los métodos de ensayo tienen que estar validados.

-Realizar el registro de datos, de forma manual y/o con instrumentos de registro, para demostrar que se aplican realmente los procedimientos necesarios de muestreo, inspección y ensayo. Es necesario registrar e investigar a fondo cualquier desviación.

-Los productos terminados tienen que contener los principios activos de acuerdo a la composición cualitativa y cuantitativa de la Autorización de Comercialización, poseer la pureza necesaria y encontrarse en un envase apropiado y correctamente etiquetado.

-Llevar un registro con los resultados de la inspección, y evaluar formalmente los ensayos realizados en los materiales y productos intermedios, a granel y terminados, conforme a sus especificaciones. La valoración de los productos incluye la revisión y evaluación de la correspondiente documentación de producción y el estudio de las desviaciones de los procedimientos especificados.

-No se autoriza la venta ni distribución de ningún lote de producto antes de que una persona cualificada certifique que dicho producto cumple los requisitos de la Autorización de Comercialización.

-Conservar suficientes muestras de referencia de los materiales de partida y de los productos para posibilitar el futuro examen del producto en caso necesario, y el producto se mantiene en su envase final, salvo que se produzcan envases excepcionalmente grandes.

1.3.4. Validación de métodos analíticos

Cualquier método de análisis que quiera utilizarse para llevar a cabo el control de calidad de productos farmacéuticos, y que no se trate de un método oficial, debe someterse a un proceso de validación para que pueda ser aceptado en análisis de rutina.

1.3.4.1. Definición de validación

Existen múltiples definiciones de validación, entre las cuales se encuentra la enunciada por el BOE nº 103 de 30 de abril de 1985: "Se llama validación a la obtención de pruebas, convenientemente documentadas, demostrativas de que un método de fabricación o de control es suficientemente fiable para producir el resultado previsto dentro de los intervalos definitivos".

A pesar de que los términos dados en las distintas definiciones existentes son diferentes, el significado es siempre el mismo: a) especificar e implantar, b) aprobar y c) documentar.

En el ámbito de la Química Analítica la definición de validación podría describirse como "establecimiento de la evidencia documental que un procedimiento analítico

conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos”⁸⁹.

1.3.4.2. Otros términos relacionados con la validación

Validación, cualificación y calibración son conceptos que suelen emplearse de forma indistinta, sin embargo, conceptualmente son diferentes. *Validar* es verificar y documentar que un método o proceso hace lo que tiene que hacer. *Cualificar* es dotar o verificar las cualidades o características inherentes a un aparato (máquina, equipo, instrumento, etc). *Calibrar* es realizar el conjunto de operaciones que determinan la relación entre los valores indicados por el sistema de medición y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia. Por consiguiente, se puede decir que los métodos deben ser validados y los instrumentos cualificados, mientras que la calibración es una parte de la cualificación.

En la figura 1.6 se observa la secuencia que se ha de llevar a cabo en la validación⁹⁰.

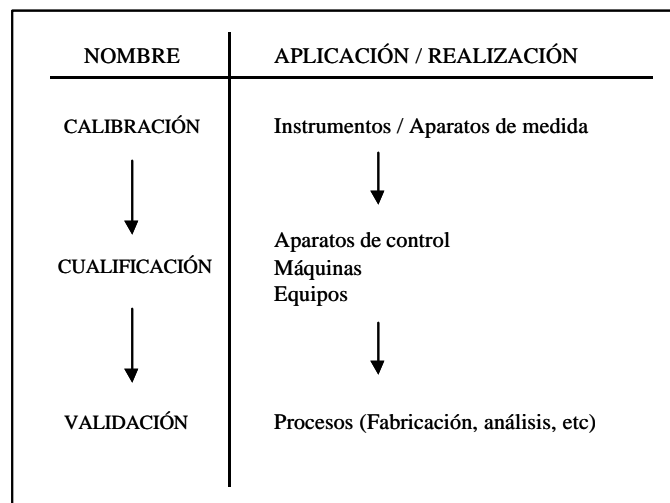


Figura 1.6. Secuencia de una validación.

1.3.4.3. Tipos de validación

En general, se pueden considerar tres tipos de validación de métodos analíticos⁹¹:

-Validación Prospectiva: para metodías nuevas.

-Revalidación: repetición total o parcial de una validación para verificar que el método analítico validado continúa siendo suficientemente fiable en el tiempo, o tras realizar modificaciones respecto al método inicial.

-Validación Retrospectiva: para metodías repetidamente utilizadas, no validadas anteriormente y de las cuales se tiene documentación suficiente para probar la bondad del método.

1.3.4.4. Razones que justifican la validación de métodos analíticos

A menudo, cuando se plantea llevar a cabo la validación de un método analítico, se piensa en los problemas de tiempo y material que supone un estudio exhaustivo, olvidando las ventajas que representa:

-Demostrar que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas. La validación es la herramienta que permite obtener las pruebas documentales al respecto.

-Trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados, lo cual a su vez minimiza el número de fallos y repeticiones permitiendo un importante ahorro de costes.

-Trabajar con métodos validados permite no sólo el conocimiento del método analítico sino también cumplir con las exigencias legales tanto del registro de especialidades farmacéuticas como de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), con el fin de asegurar la calidad y eficacia del producto.

-La validación es también un paso o requisito previo de los procesos de transferencia de métodos analíticos.

Para iniciar la validación es necesario previamente:

-Tener perfectamente caracterizado el analito.

-Trabajar con una formulación definida (en caso de especialidad), puesto que cambios en la composición, incluso a nivel de excipientes, afectarán probablemente al procedimiento analítico.

-Trabajar suficientemente con el método de análisis como para que nuestro conocimiento acerca de éste nos ofrezca garantías de que la validación puede ser satisfactoria. Sólo cuando el procedimiento está definido en todos sus detalles y se tiene el convencimiento de que las condiciones descritas son idóneas para alcanzar los resultados esperados debe iniciarse la validación. Por ello, en el desarrollo previo del método es recomendable llevar a cabo el estudio de robustez, para garantizar la bondad del procedimiento que se quiere validar.

1.3.4.5. Estrategia de validación

La estrategia general de validación puede establecerse como formada por tres etapas, que pueden definirse como:

1. *Pre-validación*: esta etapa es, en realidad, la optimización de la metodología analítica, donde se conoce el sistema y pueden preverse los problemas del método desarrollado. A partir de las necesidades, objetivos del método y de la información recogida en esta etapa, se establecerán los límites de aceptación de cada uno de los parámetros.
2. *Validación*: consiste en el análisis de una serie de muestras a lo largo de varios días y por dos analistas, como mínimo. En esta etapa se analizarán muestras que van a permitir asegurar el buen funcionamiento del método.
3. *Análisis estadístico*: del conjunto de datos generados se obtienen los parámetros analíticos de interés, tales como selectividad, precisión, exactitud, linealidad, intervalo de concentración, límite de detección y límite de cuantificación.

Los datos obtenidos a lo largo de la validación y el análisis estadístico permiten determinar los límites de confianza del método y establecer cómo se comportará en su aplicación en rutina.

Habitualmente, las validaciones de métodos de análisis se llevan a cabo por el personal del propio laboratorio que ha desarrollado el método, dando lugar a lo que se denomina *validación interna*. Los métodos de análisis pueden ser validados conjuntamente por personal perteneciente al propio laboratorio y laboratorios ajenos, dando lugar en este caso a *validaciones mixtas*. Este tipo de validaciones da lugar a validaciones mediante estudios colaborativos (interlaboratorios), dando más firmeza a los resultados obtenidos mediante el método propuesto. También existe la posibilidad de utilizar métodos validados por otros laboratorios, es decir, basar los resultados en una *validación externa*. En este caso, aunque *a priori* el método puede ser utilizado directamente, debe cumplirse con la etapa de entrenamiento, necesaria para conseguir resultados que cumplan los criterios de aceptación de la validación.

1.3.4.6. Validación de métodos de análisis en la industria farmacéutica

En la bibliografía pueden encontrarse distintas guías para llevar a cabo validaciones, ya sea desde una vertiente teórica⁹², o práctica^{93,94}. Desde un punto de vista oficial existen normativas generales editadas por la *United States Pharmacopeia (USP)*⁹⁵, *International Conference on Harmonisation (ICH)*⁹⁶ y *Food and Drug Administration (FDA)*⁹⁷, siendo la normativa ICH la más extendida. Sin embargo, la mayoría de estas guías están dirigidas a la validación de métodos cromatográficos, con lo que la validación de otros métodos se convierte en un proceso sin reglas preestablecidas.

Los métodos basados en espectroscopia NIR presentan importantes diferencias respecto a los métodos cromatográficos (no hay tratamiento de la muestra, los espectros están influenciados por las características físicas y químicas de la misma, se utilizan técnicas de calibración multivariable), provocando que éstos no puedan ser validados utilizando las normativas generales. En la bibliografía existen distintos enfoques para llevar a cabo las validaciones de métodos NIR⁹⁸⁻¹⁰².

El gran número de artículos publicados sobre validación de métodos NIR ha provocado que los organismos oficiales empiecen a redactar guías para llevarlas a cabo¹⁰³.

En general, la validación de métodos ha de incluir estudios de selectividad, linealidad, exactitud, precisión, intervalo de concentración, límite de detección, límite de cuantificación y robustez. El hecho de que sea necesario evaluar unos u otros parámetros dependerá básicamente del tipo de ensayo realizado. En la tabla 1.3 se muestra, de forma resumida, los parámetros que, según la guía ICH Q2A, deben ser evaluados.

Tabla 1.3. Parámetros a evaluar en la validación de diferentes ensayos analíticos.

Parámetros	Identificación	Test de impurezas		Determinación de contenido
		Cuantitativo	Límite	
Exactitud	x	3	x	3
Precisión:				
Repetitividad	x	3	x	3
Precisión intermedia	x	3(1)	x	3(1)
Selectividad (2)	3	3	3	3
Límite de detección	x	x(3)	3	x
Límite de cuantificación	x	3	x	x
Linealidad	x	3	x	3
Rango	x	3	x	3

x no evaluado habitualmente

3 evaluado habitualmente

(1) En los casos en que se realiza la reproducibilidad no es necesario evaluar la precisión intermedia

(2) La falta de selectividad de un método puede ser compensada por otros métodos

(3) Puede ser necesario en algunos casos

A continuación se realizará una descripción de cada uno de los parámetros, utilizando la terminología usada por la ICH.

1.3.4.6.1. Selectividad

La selectividad es la capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultáneamente o separadamente los analitos de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra.

Tanto la ICH como la USP utilizan el término especificidad, aunque éste debería reservarse para aquellas situaciones donde la respuesta obtenida sólo se puede producir con una única entidad química, algo que no es posible cuando se refiere a procedimientos analíticos que emplean instrumentación no específica. Como existen muy pocos métodos que den respuesta sólo a un único analito, el término selectividad es normalmente más apropiado⁸⁹.

La presencia de interferencias puede tener distintos efectos en la determinación del analito como imposibilitar su inequívoca identificación (aparición de falsos positivos) o distorsionar su respuesta.

La selectividad de un método analítico se debería determinar antes de iniciar el estudio de cualquier otro parámetro de validación, dado que debe conocerse en qué grado la respuesta del método es únicamente proporcionada por el analito, sin interferencia de otras sustancias relacionadas con él de una u otra forma.

Los criterios de selectividad que debe cumplir un método pueden diferir dependiendo de la finalidad con que se aplique. El grado de selectividad asociado a un método adquiere mayor relevancia si su finalidad es evaluar la estabilidad del principio activo o del preparado farmacéutico. El método ha de permitir distinguir entre todas las posibles especies químicas existentes o que puedan generarse. Sin embargo, para un método de control de calidad de rutina, la existencia de alguna interferencia se podría aceptar si ésta es conocida y de magnitud aceptable. En estos casos la selectividad puede entrar en conflicto con el coste y el tiempo necesarios para la determinación del analito.

Así pues, dependiendo del objetivo del método analítico, los procedimientos necesarios para evaluar la selectividad son diferentes. ICH distingue dos categorías en la evaluación de la selectividad: identificación y métodos cuantitativos.

En los métodos de identificación se debe demostrar que el método es capaz de discriminar entre el analito y sustancias con estructuras muy similares que puedan estar presentes en la muestra. El proceso de discriminación puede confirmarse obteniéndose

resultados positivos en el análisis de muestras que contienen el analito frente a resultados negativos en muestras que no lo contienen. Además, el test de identificación puede aplicarse a sustancias relacionadas con el analito para confirmar que no se obtiene respuesta positiva. Las interferencias potenciales que deben considerarse han de seleccionarse con criterio químico según el caso.

Los métodos cuantitativos, incluidos los tests de impurezas, han de demostrar su selectividad, teniendo los componentes individuales bien caracterizados. Cuando se utiliza un ensayo no selectivo, otros métodos de análisis pueden ser utilizados para demostrar la selectividad global.

1.3.4.6.2. Linealidad

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un intervalo de concentración establecido.

Si una inspección visual del gráfico de la señal analítica en función del contenido de analito confirma que existe una relación lineal, los resultados pueden ser analizados mediante parámetros estadísticos, como una regresión lineal por mínimos cuadrados (coeficiente de correlación, ordenada en el origen, pendiente y error estándar relativo de la regresión). En el caso que la respuesta analítica no sea lineal con la concentración, ésta debe describirse por una función adecuada.

Para evaluar la linealidad se recomienda un mínimo de cinco concentraciones, que cubran el intervalo de concentraciones del método, obtenidas directamente por dilución de una solución stock del analito y/o por preparación de muestras sintéticas (pesada directa de los componentes puros del preparado).

1.3.4.6.3. Rango o intervalo de concentración

El rango se define como el intervalo de concentración superior e inferior del analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito.

El intervalo de concentraciones mínimo que habitualmente debe especificarse dependerá del tipo de análisis. Así pues, para análisis cuantitativo éste es de 80-120% de la concentración del test, para uniformidad de contenido es de 70-130%, para test de disolución es $\pm 20\%$ el intervalo de concentraciones especificado, etc.

1.3.4.6.4. *Exactitud*

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado como valor verdadero o de referencia y el valor experimental encontrado.

De la definición de exactitud surge el principal problema, ya que en muchos casos se desconoce el valor verdadero. Cuando se dispone de patrones de referencia certificados, el valor de dicho patrón es el que se acepta como valor verdadero y la exactitud puede evaluarse aplicando el método sobre dicho patrón, o bien analizando muestras de placebo o problema a las que se les ha añadido una cantidad conocida de dicho patrón. También se acepta la comparación de los resultados con un método de referencia validado del que ya se ha demostrado su exactitud; entonces el valor verdadero es el que se obtiene con dicho método y se compara con el valor hallado con el método nuevo que se quiere validar.

La exactitud debe demostrarse en todo el intervalo de concentraciones especificado para el método analítico. Se recomienda un mínimo de 9 determinaciones sobre 3 niveles de concentración del analito (por ejemplo, 3 determinaciones x 3 niveles).

Según la ICH, la exactitud se debe evaluar en métodos de análisis para la determinación de materia prima, de producto acabado y de impurezas.

Matemáticamente la exactitud puede expresarse como porcentaje de recuperación del ensayo o como la diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero con sus intervalos de confianza.

Estadísticamente se suele efectuar un test t de Student¹⁰⁴ para determinar si el valor medio hallado y el valor considerado como verdadero no difieren significativamente para un grado de probabilidad determinado.

La desviación de la exactitud por **exceso** se produce cuando existen interferencias y la selectividad del método no es la adecuada, obteniéndose resultados superiores al valor verdadero. En este caso, si es posible, se deberían modificar las condiciones del método

para optimizar la selectividad, o bien cambiar por otro método alternativo que sea más selectivo.

La desviación de la exactitud por **defecto** se produce cuando la matriz de la muestra es compleja y la extracción del analito requiere varios pasos, obteniéndose recuperaciones más bajas. Cuando esto ocurre es conveniente intentar optimizar la preparación de la muestra para mejorar el factor de recuperación. Si esto es muy costoso o no es posible, cuando la exactitud obtenida es repetible, es decir, tiene una precisión elevada y además es homogénea en todos los niveles de concentración estudiados, puede aplicarse un factor de corrección en el cálculo final para compensar las pérdidas del analito debidas al método de extracción⁸⁹.

1.3.4.6.5. Precisión

La precisión expresa el grado de dispersión entre una serie de medidas que incorporan múltiples tomas de una misma muestra homogénea en las condiciones establecidas.

El objetivo del estudio de precisión es conocer la variabilidad del método de ensayo, pero sin tener en cuenta su proximidad con el valor real. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias, no conducen generalmente a resultados idénticos. Los factores susceptibles de influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental, reactivos, tiempo, etc.), de aquí la importancia de dicho estudio.

Los resultados se expresan, generalmente, en términos de coeficiente de variación (CV), desviación estándar e intervalo de confianza. El nivel de exigencia de los resultados dependerá del tipo de muestra y del método utilizado. Según la ICH, la precisión puede determinarse a tres niveles distintos: repetitividad, precisión intermedia y reproducibilidad.

-Repetitividad: estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos instrumentos y reactivos...), en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.

Puede ser estudiada siguiendo dos procedimientos:

- Un mínimo de 6 determinaciones al 100% de la concentración nominal
- Un mínimo de 9 determinaciones cubriendo el intervalo especificado del método (por ejemplo, 3 replicados a 3 niveles de concentración).

-Precisión intermedia: estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en condiciones operativas diferentes (distintos analistas, instrumentos, días, etc.) y en un mismo laboratorio. No es necesario estudiar cada uno de estos factores individualmente, sino que es suficiente comprobar que la variabilidad aportada por el conjunto de factores está dentro de los límites establecidos. Para evaluar la influencia de los factores sobre los resultados se recomienda un diseño de experiencias.

Por lo general, la estimación de la precisión intermedia se realiza con el cálculo del coeficiente de variación global de los resultados obtenidos variando estos factores. Normalmente se aceptan valores del coeficiente de variación inferiores al doble del coeficiente de variación de la repetitividad del método. En caso de que no se cumpla es necesario evaluar cuál es el factor responsable de esta variabilidad.

-Reproducibilidad: estudia la variabilidad de los resultados inter-laboratorios y, por tanto, se considera como un estudio de precisión intermedia con el laboratorio como factor adicional. Este estudio no es obligatorio y se debe realizar en aquellos casos en que se pretenda estandarizar el procedimiento analítico, por ejemplo, para incluirlo en las farmacopeas.

En la tabla 1.4 se resumen los factores que pueden o no variar en el estudio de la repetitividad, precisión intermedia y reproducibilidad⁸⁹.

Tabla 1.4. Factores que pueden variar en el estudio de la precisión.

	Repetitividad	Precisión Intermedia	Reproducibilidad
Instrumento	Mismo	Diferente	Diferente
Día de análisis	Mismo	Diferente	Diferente
Analista	Mismo	Diferente	Diferente
Otros factores (reactivos, condiciones ambientales,...)	Mismo	Diferente	Diferente
Laboratorio	Mismo	Mismo	Diferente

1.3.4.6.6. Límite de detección

El límite de detección (LD) se define como la mínima cantidad de analito que se puede detectar en la muestra, aunque no sea posible cuantificarla a ese nivel de concentración. Por tanto, es sólo un término cualitativo.

Para determinar el límite de detección pueden realizarse diferentes aproximaciones, dependiendo de si el método es instrumental o no, utilizando protocolos basados en:

- Inspección visual en métodos no instrumentales, por ejemplo en cromatografía de capa fina o en valoraciones.
- Relación señal/ruido, aplicable a métodos con línea base, como la espectrofotometría UV-visible o la cromatografía líquida o de gases.
- Desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la recta de calibrado. Asimismo, los parámetros necesarios para estos cálculos pueden determinarse utilizando distintas vías.

La guía ICH establece como necesaria la determinación del límite de detección en métodos de análisis destinados a la evaluación de impurezas mediante ensayos límite. Esto es, ensayos en los que simplemente se determina si la cantidad de impureza presente en la muestra es superior o no al límite establecido en especificaciones, sin dar un valor numérico.

1.3.4.6.7. Límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LC) es la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales normales, con una adecuada precisión y exactitud.

Para evaluarlo pueden utilizarse los mismos métodos que en el límite de detección, aunque los parámetros de aceptación son ligeramente distintos.

1.3.4.6.8. Robustez

La robustez es la capacidad del método analítico para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando idea de su “estabilidad” durante su utilización en rutina. Es, por tanto, la capacidad que demuestra el procedimiento de análisis para proporcionar resultados válidos en presencia de pequeños cambios respecto de las condiciones descritas en el método, susceptibles de producirse durante su utilización.

La robustez (*robustness*) no debe confundirse con la solidez (*ruggedness*). Este último no se menciona en las guías ICH, pero sí en la Farmacopea USP. Ésta define el término solidez como el grado de reproducibilidad de los resultados mediante el análisis de las mismas muestras bajo una variedad de condiciones, tales como diferentes laboratorios, analistas, instrumentos, lotes de reactivos, días, tiempos, temperaturas, etc. Es decir, se sigue el método analítico dentro de los parámetros especificados en él, pero introduciendo en las condiciones experimentales las variaciones ambientales y operacionales del método en los resultados, por lo que se podría asimilar al término reproducibilidad.

La guía ICH recomienda incluir la robustez en una fase apropiada del desarrollo del método y no en la validación propiamente dicha, dado que si la robustez del método no se comprueba con anterioridad a iniciar la validación, puede suceder que se intente validar un método poco robusto, con los consiguientes malos resultados y pérdida de tiempo y dinero.

Los parámetros a evaluar en cualquier método de análisis pueden ser tanto parámetros cuantitativos (influencia del valor de pH, del valor de la temperatura, porcentaje de componente orgánico en la fase móvil de cromatografía líquida, ...) como cualitativos (fabricante de la columna cromatográfica, de un determinado reactivo, ...).

En el caso de determinar que hay parámetros que afectan al método de análisis, éstos deberán ser controlados y el método deberá incluir recomendaciones de cómo mantenerlos bajo control.

1.3.4.6.9. Test de Idoneidad del sistema

El test de idoneidad del sistema (*system suitability test*) consiste en un conjunto de ensayos que permiten comprobar, en el momento de utilización del método, que el sistema (analista, reactivos e instrumental) es adecuado para llevar a cabo la determinación para la que se ha establecido y validado dicho método. Por tanto, este test se ha de entender como parte integrante del procedimiento de análisis y requisito previo a su realización. En la práctica podría equipararse a una cualificación del proceso analítico o una “revalidación en continuo”, ya que proporciona la seguridad de que en el momento de iniciar el ensayo el conjunto del sistema continúa siendo “válido” para el propósito para el que fue concebido.

1.3.4.7. Revalidación

La revalidación se define, tal y como se ha dicho anteriormente, como la verificación, mediante pruebas que se han de documentar, de que un método analítico previamente validado, continúa siendo suficientemente fiable en el tiempo o tras realizar alguna modificación respecto al método inicial.

Se puede requerir una revalidación en los siguientes casos⁸⁹:

- Paso del tiempo: para demostrar que el método sigue siendo válido.
- Cambio en la muestra: siempre que cambie el tipo de muestra (por ejemplo, cambios cualitativos o cuantitativos en excipientes de una especialidad farmacéutica).
- Cambio en el proceso de síntesis del analito que genere un nuevo perfil de impurezas.
- Cambio de instrumentos o materiales: cuando se produzcan cambios sustanciales en los instrumentos o materiales utilizados.

-Cambio de laboratorio: es necesario demostrar que un método validado sigue siendo fiable cuando se aplica en otro laboratorio.

-Modificaciones de parámetros analíticos: cuando se ha realizado una modificación de algún parámetro (por ejemplo, tiempos de agitación, proceso de extracción, concentración,...).

Los pasos a seguir en una revalidación serán:

-Definir el cambio y documentarlo.

-Ver si el cambio está dentro del ámbito de aplicación, parámetros y límites establecidos en el método.

-Determinar el grado de revalidación a realizar en función del cambio.

-Realizar la validación de los parámetros elegidos.

-Definir y realizar los correspondientes tests de idoneidad del sistema.

El grado de revalidación requerido depende de la naturaleza de los cambios realizados y del criterio de la persona responsable, pudiendo reducirse para algunos parámetros el trabajo experimental necesario.

1.4. BIBLIOGRAFÍA

1. B.G. Osborne, T. Fearn, P.H. Hindle, *Practical NIR Spectroscopy with applications in food and beverage analysis*, 2nd ed., Longman Scientific & Technical, Harlow, Essex, England, 1993.
2. W. Herschel, *Phylosophical Transactions of the Royal Society*, **90**, 255, 1800.
3. W. Kaye, *Spectrochimica Acta*, **6**, 257, 1954.
4. R.F. Goddu, *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*, ed. Reilly, Ch. N. Interscience, New York, 1960.
5. K.H. Norris, *Trans. Am. Soc. Agric. Eng.*, **7**, 240, 1964.
6. I. Ben-Gera, K.H. Norris, *J. Food. Sci.*, **7**, 240, 1968.
7. W.F. McClure, *Anal. Chem.*, **66**, 43A, 1994.

8. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, C de la Pezuela, *Analyst*, **123**, 135R, 1998.
9. M. Blanco, J. Coello, J.M. García-Fraga, H. Iturriaga, S. MasPOCH, J. Pagès, *Analyst*, **122**, 777, 1997.
10. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, J. Pagès, *Anal. Chim. Acta*, **383**, 291, 1999.
11. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, J. Pagès, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **50** 75, 2000.
12. F.A. DeThomas, J.W. Hall, S.L. Monfre, *Talanta*, **41**, 425, 1993.
13. M. Blanco, S. MasPOCH, I. Villarroya, X. Peralta, J.M. González, J. Torres, *Appl. Spectrosc.*, **55**, 834, 2001.
14. M. Blanco, S. MasPOCH, I. Villarroya, X. Peralta, J.M. González, J. Torres, *Anal. Chim. Acta*, **434**, 133, 2001.
15. M. Blanco, S. MasPOCH, I. Villarroya, X. Peralta, J.M. González, J. Torres, *Analyst*, **126**, 378, 2001.
16. E.W. Ciurczak, *Handbook of Near-infrared análisis, Practical spectroscopy series Vol. 13*, E, Burns, D.A. y Ciurczak, E. W., Marcel Dekker Inc., New York, 1992.
17. P. Kubelka, F. Munk, *Z. Tech. Physik*, **12**, 593, 1931.
18. United States Patent, Patente número 4.286.327, 1981.
19. A.S. Bonano, P.R. Griffiths, *Appl. Spectrosc.*, **49**, 1590, 1995.
20. A.S. Bonano, P.R. Griffiths, *Appl. Spectrosc.*, **49**, 1598, 1995.
21. H.H. Willard, L.L. Merritt Jr., J.A. Dean, F.A. Settle Jr., *Métodos instrumentales de análisis*, Grupo Editorial Iberoamérica, México D.F., 1991.
22. J.S. Schenk, J.J. Workman Jr., M.O. Westerhaus, en *Handbook of Near-Infrared Analysis*, ed. D.A. Burns, E.W. Ciurczak, Marcel Dekker Inc., New York, cap. 15, 1992.
23. J.T. Diffe, en *Handbook of Near-Infrared Analysis*, ed. D.A. Burns, E.W. Ciurczak, Marcel Dekker Inc., New York, vol.13, cap. 16, 1992.
24. D.A. Skoog, J.J. Leary, *Análisis Instrumental*, 4^a ed., McGraw-Hill, Madrid, 1994.
25. United States Patent, Patente número 3.861.788, 1973.
26. United States Patent, Patente número 4.082.464, 1976.
27. C.D. Tran, *Anal. Chem.*, **64**, 971A, 1992.

28. P.J. Treado, I.W. Levin, E.N. Lewis, *Appl. Spectrosc.*, **46**, 553, 1992.
29. P.M. Epperson, J.V. Sweedler, R.B. Bilhorn, G.R. Sims, M.B. Denton, *Anal. Chem.*, **60**, 327A, 1988.
30. Q.S. Hanley, C.W. Earle, F.M. Pennebaker, S.P. Madden, M.B. Denton, *Anal. Chem.*, **68**, 661A, 1996.
31. J.B. Callis, D.L. Illman, B.R. Kowalski, *Anal. Chem.*, **59**, 624A, 1987.
32. D. Coombs, G. Poulter, A.I. Thomson, *Spectroscopy Europe*, **10** (5), 10, 1998.
33. B.A. Kirsch, J.P. Chauvel, D.P. Denton, S.V. Lange, D.R. Lafavor, R.A. Bredeweg, W.K. Winnett, J.L. Dinero, *Process Control and Quality*, **8**, 75, 1996.
34. C. Hassell, E.M. Bowman, *Appl. Spectrosc.*, **52** (1), 18A, 1998.
35. B.D. Mindel, *Process Control and Quality*, **9**, 173, 1997.
36. R. Mackinson, S.J. Brinkworth, R.M. Belchamber, R.E. Aries, D.J. Cutler, C. Deeley, H.M. Mould, *Appl. Spectrosc.*, **46** (6), 1020, 1992.
37. M. Hartnett, G. Lightbody, G.W. Irwin, *Analyst*, **121**, 749, 1996.
38. P.H. Hindle, *Process Control and Quality*, **9**, 105, 1997.
39. R.C. Moessner, *Process Control and Quality*, **2**, 237, 1992
40. D.L. Massart, B.G.M. Vandegiste, S.N. Deming, Y. Michotte, L. Kaufman, *Chemometrics: a textbook*, Elsevier, Amsterdam, 1988.
41. L.S. Aucott, P.H. Garthwaite y S.T. Buckland, *Analyst*, **113**, 1849, 1988.
42. G. Downey, P. Robert, D. Bertrand, *Anal. Proc.*, **29**, 8, 1992.
43. P. Geladi, M. MacDougall, H. Martens, *Appl. Spectrosc.*, **39**, 491, 1985.
44. R.J. Barnes, M. S. Dhanoa, S.J. Lister, *Appl. Spectrosc.*, **43**, 772, 1989.
45. A. Savitzky, M.J.E. Golay, *Anal. Chem.*, **36**, 1627, 1964.
46. S. Wold, H. Antii, F. Lindgren, J. Öhman, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **44**, 175, 1998.
47. J. Sjöblom, O. Svensson, M. Josefson, H.Kullberg, S. Wold, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **44**, 229, 1998.
48. M. Blanco, J. Coello, I. Montoliu, M.A. Romero, *Anal. Chim. Acta*, **434**, 125, 2001.
49. J.E. Jackson, *User's Guide to Principal Componentes*, Wiley, New York, 1991.
50. S. Wold, K. Esbensen, P. Geladi, *Chemom. Int. Lab. Syst.*, **2**, 37, 1987.
51. P. Geladi, B.R. Kowalski, *Anal. Chim. Acta*, **185**, 1, 1985.

52. M. Blanco, R. Boqué, R. Cela, J. Coello, S. Maspoch, M.C. Ortiz, J. Riba, X. Rius, A. Ruiz, L.A. Sarabia, X. Tomás, *Avances en Quimiometría Práctica*, Universidad de Santiago de Compostela, 1994.
53. H. Wold, *Multivariate Analysis*, Ed. Krishnaiah, P.R. Academic Press, New York, 1966.
54. CAMO AS, *The Unscrambler, User's Guide*, 1998.
55. J. Workman Jr., P.R. Mobley, B.R. Kowalski, R. Bro, *Appl. Spectrosc. Rev.*, **31**, 73, 1996.
56. M. Blanco, J. Coello, J. Iturriaga, S. Maspoch, C. de la Pezuela, E. Russo, *Anal. Chim. Acta*, **298**, 183, 1994.
57. H. Brik, C. van der Vlies, *Pharmaeuropa*, **3(1)**, 3, 1991.
58. Vision v. 2.00 software manual; NIRSystem Inc., Silver Spring, MD, 1998.
59. Perstop Analytical. Nota técnica 0554, 1996.
60. W. Plugge, C. van der Vlies, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **11**, 435, 1993.
62. W. Plugge, C. van der Vlies, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **10**, 797, 1992.
62. F. González, R. Pous, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **13**, 419, 1995.
63. H.L. Mark, *Anal. Chem.*, **59**, 790, 1987.
64. D.A. Tunnell, *Anal. Proc.*, **27**, 59, 1990.
65. H. Martens, T. Naes, *Multivariate Calibration*, John Wiley & Sons, Chichester, 1989.
66. H. Martens, T. Naes, *Multivariate Calibration by Data Compression en Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*, Ed. P. Williams y K. Norris, American Society of Cereal Chemist, Inc. St. Paul, Minnesota, 1987.
67. D.M. Haaland, R.G. Easterling, *App. Spectrosc.*, **34**, 539, 1980.
68. W.R. Hruschka, *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*, Eds. P. Williams y K. Norris, American Society of Cereal Chemist Inc., St. Paul, Minnesota, 1987.
69. J.C. Sternberg, H.S. Stills, R.H. Schwendeman, *Anal. Chem.*, **32**, 84, 1960.
70. N. Draper, H. Smith, *Applied Regression Analysis*, Wiley, New York, 1981.
71. S.D. Frans, J.M. Harris, *Anal. Chem.*, **57**, 2680, 1985.
72. E.V. Thomas, D.M. Haaland, *Anal. Chem.*, **62**, 1091, 1990.

73. W.R. Hruschka, *Data Analysis: Wavelength Selection Methods en Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*, Eds. P. Williams y K. Norris, American Society of Cereal Chemist Inc., St. Paul, Minnesota, 1987.
74. D.A. Burns, E.W. Ciurczak, *Handbook of Near-Infrared Analysis, Practical Spectroscopy Series*, Vol. 13, Marcel Dekker Inc., New York, 1992.
75. K.R. Beebe, B.R. Kowalski, *Anal. Chem.*, **59**, 1007A, 1987.
76. H. Mark, *Anal.Chim. Acta*, **223**, 75, 1989.
77. D.E. Honigs, G. M. Hieftje, T.B. Hirschfeld, *App. Spectrosc.*, **38**, 317, 1983.
78. D.R. Cook, S. Weisberg, *Residual and Influences in Regression*, Chapman & Hall, New York, 1982.
79. H. Wold, *Soft Modeling by Latent Variables; the Non-linear Iterative Partial Least Squares Approach*, en *Perspectives in Probability and Statistics, Papers in Honour of M. S. Bartlett*, Ed. J. Gani, Academic Press, London, 1975.
80. M. Stone, R.J. Brooks, *J.R. Stat. Soc., Ser. B*, **52**, 237, 1990.
81. S. Wold, *Technometrics*, **20**, 397, 1978.
82. E.R. Malinowsky, *Factor Analysis in Chemistry*, 2ª Ed., Wiley, New York, 1991.
83. D.W. Osten, *J. Chemometrics*, **2**, 39 1988.
84. D.M. Haaland y E. V. Thomas, *Anal. Chem.*, **60**, 1193, 1988.
85. W.E. Deming, *Calidad, Productividad y Competitividad: la salida de la crisis*, Ed. Díaz de Santos S.A., Madrid, 1989.
86. J. Bonal, J. Sánchez, *Legislación y Farmacia*, Ed. Mapfre S.A., Madrid, 1997.
87. Ley del Medicamento, Biblioteca de Textos Legales, 2ª Ed. E. Cobreros, Madrid, 1998.
88. Normas sobre Medicamentos de la Unión Europea, Vol 4: Normas de correcta fabricación, Comisión Europea, Dirección General III-Industria Productos Farmacéuticos y cosméticos, Bruselas, 1999.
89. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (A.E.F.I.), *Validación de Métodos Analíticos*, Ed. AEFI, Barcelona, 2001.
90. R. Salazar, *Gestión de la Calidad en el Desarrollo y Fabricación Industrial de Medicamentos, Tomo II: Fabricación Industrial*, Ed. R. Salazar, Romargraf S.A., Barcelona, 2001.

91. M. Castro, S. Gascón, M. Pujol, J.M. Sans, Ll. Vicente, *Validación de Métodos Analíticos*, A.E.F.I., Sección Catalana, Comisión de normas de buena fabricación y control de calidad, 1989.
92. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A laboratory Guide to Methods Validation and Related Topics*, Eurachem Guide, Teddington, United Kingdom, 1998.
93. M.E. Swartz y I.S. Krull, *Pharm. Tech.*, **3**, 104, 1998.
94. J. Ermer, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **24**, 755, 2001.
95. U.S. Pharmacopeia 23, United States Pharmacopeial Convention, Inc., 1982-1984, 1994.
96. International Conference on Harmonization (ICH). *Harmonized Tripartite Guidelines: Validation of Analytical Procedures Methodology*, 1996.
97. *Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods*, Center of Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration (FDA), 1994.
98. A.D. Trafford, R.D. Jee, A.C. Moffat, P. Graham, *Analyst*, **124**, 1077, 1999.
99. M. Blanco, J. Coello, A. Eustaquio, H. Iturriaga, S. MasPOCH, *J. Pharm. Sci.*, **88**(5), 551, 1999.
100. M. Blanco, J. Coello, A. Eustaquio, H. Iturriaga, S. MasPOCH, *Analyst*, **124**, 1089, 1999.
101. A.C. Moffat, A.D. Trafford, R.D. Jee, P. Graham, *Analyst*, **125**, 1341, 2000.
102. H. Mark, G.E. Ritchie, R.W. Roller, E.W. Ciurczak, C. Tso, S.A. MacDonald, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **28**, 251, 2002.
103. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), *Draft: Note for guidance on the use of near infrared spectroscopy by the pharmaceutical industry and the data to be forwarded in part II of the dossier for a marketing authorisation*, Londres, 2001.
104. J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics for analytical chemistry*, Ellis Horwood, Londres, 1988.